



**Universidade de
Aveiro**

Ano 2012

Departamento de Biologia

**RUI PEDRO
MONTEIRO
BATISTA**

**CARACTERIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES DOS GENES
BRCA1 E BRCA2**



**Universidade de
Aveiro**

Ano 2012

Departamento de Biologia

**RUI PEDRO
MONTEIRO
BATISTA**

CARACTERIZAÇÃO DAS MUTAÇÕES DOS GENES BRCA1 E BRCA2

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Sérgio Castedo, Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da Professora Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos, Professora Auxiliar Convidada da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho à minha família, ao meu pai, pelo incansável apoio que sempre me deu, a educação sempre rigorosa e justa e as suas palavras sábias que sempre me orientaram e à minha mãe pelo carinho e amor dado, apoio, paciência, sapiência e experiência passada que ajudou na elaboração desta tese. Dedico ainda ao meu irmão pelo seu bom humor, amizade e grande disponibilidade, e à minha avó pela sua preocupação, sabedoria e confiança depositada em mim.

Dedico também este trabalho à Liliana Capela, minha companheira nesta “luta”, que sempre me ajudou e apoiou nos momentos mais difíceis desta jornada.

o júri

presidente

Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

arguente

Professor Doutor Fernando de Jesus Regateiro
Professora Catedrático, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

orientador

Professora Doutor Sérgio Manuel Madeira Jorge Castedo
Professor Associado, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

co-orientador

Professora Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos
Professora Auxiliar Convidada, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Ao Professor Doutor Sérgio Castedo, meu orientador, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo do desenvolvimento desta tese, assim como pelas críticas, correcções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

À Professora Doutora Maria do Céu Santos, minha co-orientadora, por me colocar o desafio de fazer a tese de mestrado, pela competência científica e orientação dada, e que é para mim um exemplo de persistência, disponibilidade e compreensão.

À Liliana Capela, pelo incansável apoio moral, ombro amigo, amizade e permanente disponibilidade, me permitiram encontrar informações e soluções que em muito contribuíram para a execução desta tese.

A todos os elementos do GDPN pela disponibilidade, boa disposição, excelente ambiente de trabalho, e cuja ajuda foi inestimável na aprendizagem das técnicas, conceitos teóricos e práticos que me permitiram desenvolver este trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Regateiro, pela disponibilidade e confiança demonstrada, para ouvir e arguir na apresentação pública deste trabalho.

A toda a minha família, que sempre me estimulou a crescer científica e pessoalmente, pelas inúmeras trocas de impressões, correções e comentários ao trabalho. Acima de tudo, pelo inestimável apoio familiar que preencheu as diversas falhas que fui tendo por força das circunstâncias, e pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes anos.

palavras-chave

BRCA1, BRCA2, cancro da mama, cancro do ovário, cancro, caracterização de mutações, rastreamento genético, perfil de mutações, hereditariedade, HBOC, Síndrome Hereditário de Cancro da Mama e Ovário, Síndrome

resumo

O cancro da mama é o tipo de neoplasia maligna mais incidente nas mulheres a nível mundial. Na maior parte dos casos tem origem esporádica, mas estima-se que cerca de 7% tem origem hereditária, relacionada com a herança genética de alguma mutação patogénica em genes de suscetibilidade para este cancro. A causa mais frequente de cancro hereditário da mama/ovário é a alteração de um dos genes BRCA (BRCA1 ou BRCA2). De fato as mutações germinativas destes genes são responsáveis por cerca de 50% dos casos de cancro hereditário da mama e/ou ovário.

São ainda poucos os dados referentes ao perfil de mutações destes genes na população portuguesa, para além da descrição de uma mutação fundadora no gene BRCA2.

Pretendeu-se com o presente estudo caracterizar, numa amostra de doentes portugueses com suspeita de cancro hereditário da mama/ovário, as mutações destes dois genes, avaliando os diferentes tipos de mutações encontradas, a prevalência de mutações comprovadamente patogénicas e, nomeadamente da mutação fundadora portuguesa. Pretendeu-se também testar o algoritmo de cálculo BRCAPro® no auxílio ao recrutamento para estudo genético de pacientes com suspeita de HBOC.

Dos 121 casos estudados por DGGE/sequenciação direta/MLPA, foram detetados 42 casos (34,7%) com alterações num dos BRCA's (excluindo polimorfismos), correspondendo a 42-45 alelos mutados. No entanto, apenas 8,3% dos casos continham mutações comprovadamente patogénicas, representando a mutação fundadora portuguesa 40% das mesmas. Comparativamente a outros estudos na população portuguesa, a prevalência de mutações patogénicas no nosso estudo foi inferior, com uma sobre-representação da mutação fundadora, o que poderá ser explicado por diferentes critérios de referência e/ou composição das amostras estudadas.

O algoritmo BRCAPro® revelou-se útil como instrumento de cálculo de probabilidade de mutação patogénica nos genes BRCA1 e BRCA2, embora não permita substituir o critério médico na de seleção de pacientes para estudo genético destes genes.

keywords

BRCA1, BRCA2, Breast Cancer, Ovarian Cancer, Cancer, Mutation characterization, Genetic Screening, Mutation Profile, Hereditariaty, HBOC, Hereditarian Breast and Ovarian Cancer Syndrome, Syndrome

abstract

Breast cancer is the type most common malignant neoplasm in women worldwide. In most cases arises sporadically, but it is estimated that about 7% have a hereditary origin, related to the genetic inheritance of some pathogenic mutation in susceptibility genes for this cancer. The most frequent cause of hereditary breast/ovarian cancer is an alteration in one of the two BRCA genes, the BRCA1 and BRCA2. Germline mutations in these two genes are responsible for about 50% of cases with hereditary breast and ovarian cancer.

Currently, few data is available referring to the mutation profile in the Portuguese population, besides the identification of a founder mutation in the BRCA2 gene.

It was intended with this study to characterize, in a sample constituted of patients with suspicion of hereditary breast/cancer, mutations of these two genes, evaluating the different types of mutations found, the prevalence of pathogenic mutations, particularly the Portuguese founder mutation. It was also intended to test the algorithm BRCAPro®, in the aid of recruitment of patients for genetic testing with suspected HBOC.

Of the 121 cases studied by DGGE/direct sequencing/MLPA, we detected 42 cases (34,7%) containing alterations in one of the BRCA genes (excluding polymorphisms), corresponding to 42-45 mutated alleles. After analysis, only 8.3% of the cases had deleterious mutations, with the founder Portuguese mutation representing 40% of those. Comparing to other studies in the Portuguese population, the prevalence of pathogenic mutations found in this study was smaller, with an overexpression of the Portuguese founder mutation. That can be explained by the use of different clinical criteria in the recruitment of patients for genetic study and/or differences in the composition of the cohort of cases.

The BRCAPro® algorithm as proved useful as a tool for the calculation of mutation probability in the BRCA1 and BRCA2 genes, although it doesn't allow to substitute the medical criteria in the selection of patients for genetic study in this two genes.

Índice

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | Introdução | 2 |
| 1.1. | Epidemiologia do cancro da mama e ovário | 2 |
| 1.1.1. | Incidência e mortalidade | 2 |
| 1.1.2. | Fatores de risco de cancro da mama | 5 |
| 1.1.3. | Fatores de risco de cancro do ovário | 6 |
| 1.2. | Genética do cancro e Predisposição hereditária | 6 |
| 1.3. | Genética do cancro da mama | 9 |
| 1.3.3. | O gene BRCA 2 | 12 |
| 1.4. | Mutações dos genes BRCA1 e BRCA2 | 14 |
| 1.4.1. | Prevalência de mutações patogénicas em diferentes raças/etnias | 14 |
| 1.4.2. | Prevalência de mutações patogénicas na população portuguesa | 14 |
| 1.5. | Identificação de pacientes com predisposição hereditária ao cancro | 16 |
| 1.6. | Prevenção e Tratamento do cancro familiar hereditário (HBOC) | 18 |
| 1.7. | Técnicas para <i>rastreio</i> de mutações nestes genes | 20 |
| 2. | Objetivos do estudo | 23 |
| 3. | Metodologia | 25 |
| 3.1. | Seleção de casos | 25 |
| 4. | Material e métodos | 27 |
| 4.1. | Extração de ADN a partir de Sangue Periférico | 28 |
| 4.2. | Quantificação do ADN extraído | 28 |
| 4.3. | Amplificação das regiões codificantes e transições intrão/exão dos genes BRCA1 e BRCA2 | 29 |
| 4.4. | Análise qualitativa dos produtos de amplificação | 30 |
| 4.5. | Reação de formação de Heteroduplexes | 30 |
| 4.6. | Processo de criação de pools de fragmentos | 33 |
| 4.7. | Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) | 33 |
| 4.8. | Visualização dos géis de DGGE | 35 |
| 4.9. | Sequenciação de produtos de PCR | 36 |
| 4.10. | Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA) | 38 |
| 5. | RESULTADOS | 41 |
| 5.1. | Caracterização de mutações na amostra previamente selecionada | 41 |
| 6. | Discussão de resultados | 49 |

| | | |
|----------|--|----|
| 6.1. | Análise mutacional dos genes BRCA1 e BRCA2..... | 49 |
| 6.1.1.1. | Comparação da prevalência de mutações patogénicas em diferentes estudos... | 49 |
| 6.1.1.2. | Comparação do perfil de mutações patogénicas em diferentes estudos..... | 52 |
| 6.1.1.3. | Caracterização das VUS..... | 55 |
| 6.2. | Estudo do algoritmo de cálculo BRCAPro® | 56 |
| 7. | Conclusão | 60 |
| 8. | Referências Bibliográficas | 63 |

Lista de Abreviaturas (Ordenadas Alfabeticamente):

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

BRC – BRC “*repeats domain*”

BRCA1 – *Breast Cancer Susceptibility Cancer Gene 1*

BRCA2 – *Breast Cancer Susceptibility Cancer Gene 2*

BRCT – BRCA1 C_*Terminal Domain*

CDK's - Quinases dependentes de Ciclina (*Cyclin-dependent kinase*)

DGGE – *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DGS – Direção Geral de Saúde

DHPLC – *Denaturing High Pressure Liquid Chromatography*

dNTP's – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados.

dsADN – AND de cadeia dupla (*Double Stranded DNA*)

DSB – Quebras duplas de DNA (*Double Stranded Breaks*)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

ER – Recetor de estrogénio (*Estrogen-receptor*)

EUA – Estados Unidos da América

HBOC – Síndrome de cancro da mama e ovário hereditário (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer*)

LOH – Perda de Heterozigotia (*Loss of heterozygosity*)

MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

NCCN – *National Comprehensive Cancer Network*

PAA - Poliacrilamida

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PR – Recetor de progesterona (*Progesterone-receptor*)

PTT – *Protein Truncation Test*

ssADN – ADN de cadeia simples (*Single Stranded DNA*)

SSCP – *Single-Strand Conformation Polymorphism*

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato-EDTA

TEMED – Tetrametiletilenediamina

UTR – Região não traduzida (*Untranslated Region*)

VUS – Variantes de significado desconhecido (*Variants of Uncertain Significance*)

WHO – Organização mundial de saúde (*World Health Organization*)

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O cancro da mama é o tipo de neoplasia maligna mais incidente nas mulheres a nível mundial. Na maior parte dos casos tem origem esporádica, mas estima-se que cerca de 7% tem origem hereditária, relacionada com a herança genética de uma ou mais mutações patogénicas em genes de suscetibilidade para este cancro (Claus *et al.*, 1996). Foram já descritos vários genes de suscetibilidade para cancro da mama, nomeadamente BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN e outros (Campeau *et al.*, 2008). As mutações germinativas nos genes BRCA1 ou BRCA2 explicam a alta incidência de cancro da mama e ovário na maioria das famílias com cancro hereditário da mama/ovário.

A identificação de mutações associadas a doença nestes dois genes permite a utilização de manobras preventivas em pacientes portadores de mutação e nos seus familiares, e liberta os familiares não portadores de mutação do *stress* psicológico associado à consciência de um risco elevado de cancro e da necessidade de vigilância clínica intensa.

O principal objetivo desta tese consiste em definir o perfil de mutações destes genes numa amostra de doentes portugueses, com suspeita de Síndrome de Cancro da Mama e Ovário Hereditário (HBOC) e perceber se os critérios de seleção de pacientes para este estudo serão os mais corretos e fidedignos.

Alguns conceitos teóricos vão ser apresentados nesta introdução teórica, por forma a ajudar à compreensão de toda a metodologia utilizada neste trabalho.

1.1. Epidemiologia do cancro da mama e ovário

1.1.1. Incidência e mortalidade

Portugal apresenta um perfil epidemiológico típico dos países desenvolvidos, no que respeita ao cancro da mama, próstata, pulmão e cólon (Globocan, 2008) (Figura 1).

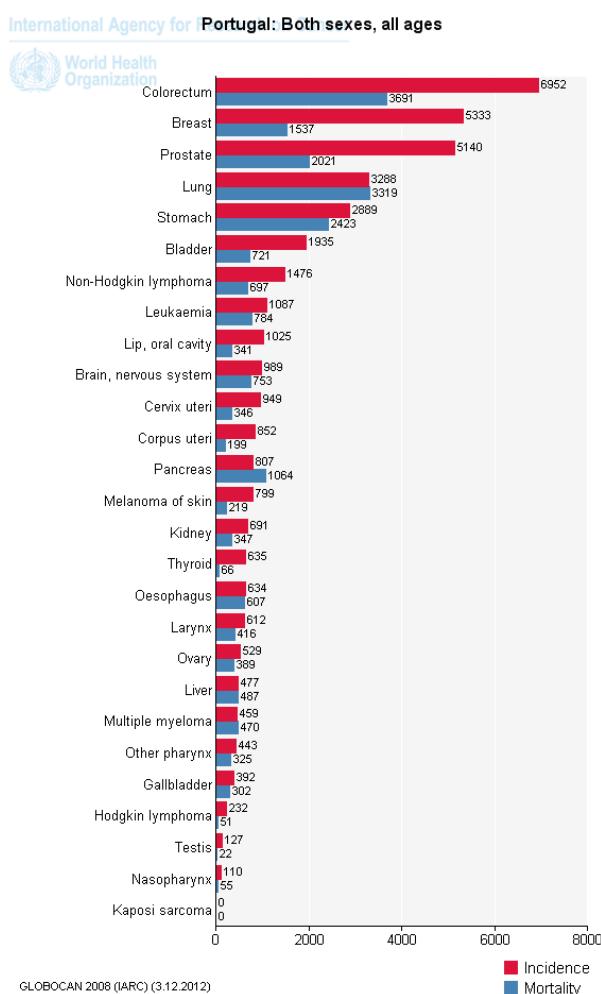


Figura 1 - Perfil epidemiológico das neoplasias em Portugal (Globocan, 2008)

Estes tipos de cancro são mais frequentes nos países desenvolvidos, estando diretamente associados ao estilo de vida. Estão relacionados com o tipo de dieta, consumo de tabaco, falta de exercício físico e exposição a uma ampla gama de fatores de risco decorrentes do processo de industrialização e urbanização, destacando-se, entre estes, a exposição a substâncias químicas e hormonas (Cocco *et al.*, 2002).

No entanto, apesar da incidência crescente, e no que concerne ao cancro da mama, aceita-se que aproximadamente 90% dos cancros da mama serão curáveis se forem detetados precocemente e tratados corretamente (POP, 2011).

Os números do cancro da mama em Portugal são preocupantes, mostrando que mais de 1 em cada 10 mulheres irá desenvolver cancro da mama em algum momento da sua vida (DGS-2001). Em Portugal, em 2008, a taxa de incidência de cancro da mama nas mulheres foi de $60,0/10^5$ e de cancro de ovário foi de $8,6/10^5$ habitantes. A taxa de mortalidade nesse ano foi de $13,5/10^5$ e $3,2/10^5$ habitantes em indivíduos do sexo feminino para cancro da mama e cancro de ovário, respetivamente (Globocan, 2008).

Em Portugal são diagnosticados anualmente cerca de 4500 novos casos, e 1500 mortes devido a esta doença (DGS, 2009).

Apesar dos enormes avanços verificados na última década ao nível das técnicas de rastreio, diagnóstico e tratamento, o cancro da mama representa o

cancro mais frequente em mulheres, e esta neoplasia permanece o segundo tipo de cancro mais frequente em todo o mundo, suplantado apenas pelo cancro do pulmão se considerarmos ambos os sexos (Jemal *et al.*, 2010, Globocan, 2008). As estimativas apontam para aproximadamente 209 mil novos casos e 40 mil mortes por cancro da mama (99% das quais mulheres e apenas 1% homens) no ano de 2010 nos EUA (Jemal *et al.*, 2010).

Estas estimativas referem que este cancro representa 28% de todos os novos casos de cancro diagnosticados anualmente em mulheres a nível mundial (Jemal *et al.*, 2010). Nos países menos desenvolvidos a incidência é menor, nomeadamente em determinadas regiões do continente africano e nas regiões sul e oriental do continente asiático, onde a probabilidade de desenvolver cancro da mama até aos 75 anos é um terço da dos restantes países desenvolvidos (Parkin *et al.*, 2001).

Por outro lado, o cancro do ovário, neoplasia também relacionada com a síndrome hereditária ligada aos genes BRCA1 e BRCA2, representa na sua totalidade (esporádico e hereditário) aproximadamente 30% dos tumores do aparelho genital feminino. Em países desenvolvidos esta neoplasia é tão comum como o cancro do útero (35%) ou do colo do útero (27%) (Tavassoli e Devilee, 2003). Um estudo estima que em 2010 foram diagnosticados 21.880 novos casos de cancro do ovário nos EUA, o que representa 3% de todos os novos casos de cancro diagnosticados anualmente em mulheres (Jemal *et al.*, 2010).

Retrospectivamente, estima-se que em 2002 tenham ocorrido mais de 1.1 milhões de novos casos de cancro da mama e pouco mais de 200 mil novos casos de cancro do ovário em indivíduos do sexo feminino em todo o mundo, e cerca de 410 mil e 124 mil de mortes por cancro da mama e cancro do ovário, respetivamente (Globocan, 2002).

O cancro da mama no homem é raro, representando menos de 1% de todos os cancros da mama, embora se assista a um aumento da sua incidência (Weiss *et al.*, 2005).

1.1.2. Fatores de risco de cancro da mama

Uma proporção substancial de casos com cancro da mama esporádico em países desenvolvidos pode ser explicada por fatores que influenciam a exposição aos estrogénios, incluindo fatores reprodutivos e hormonais, obesidade, álcool e atividade física. A título de exemplo, um estudo recente estima que, no Reino Unido, cerca de 27% dos casos de cancro de mama em mulheres estão ligados a vários fatores ambientais variáveis e ao estilo de vida (Parkin *et al.*, 2011).

O fator de risco mais preponderante no cancro da mama (a seguir ao género) é a idade: quanto maior a idade, maior o risco.

As mulheres de raça branca apresentam maior incidência de cancro da mama relativamente às mulheres afro-americanas, o que é explicado provavelmente pelo fato das mulheres de raça branca terem em média menos filhos e um período de amamentação mais curto. No que respeita à paridade, verificou-se que mulheres que tenham tido pelo menos uma gravidez têm um risco de desenvolver cancro da mama 25% menor do que mulheres que nunca tiveram filhos. Esta proteção aumenta com o número de gravidezes, atingindo os 50% em mulheres com cinco ou mais filhos (Ewertz *et al.*, 1990). A relação entre amamentação e risco de cancro da mama é controversa, mas alguns estudos realizados em países menos desenvolvidos (período de amamentação superior) indicam que a amamentação tem um efeito protetor (Lipworth *et al.*, 2000).

O risco de cancro da mama aumenta com menarca precoce e menopausa tardia devido ao maior período de exposição às hormonas femininas (Kelsey *et al.*, 1993). Os níveis elevados de prolactina estão também associados a um aumento do risco de cancro da mama, particularmente em tumores com recetores de estrogénio (Tworoger *et al.*, 2007).

Também os contraceptivos orais assim como a terapia de substituição hormonal, aumentam o risco de cancro da mama, embora este efeito diminua bastante após a cessação do seu uso (Zhu *et al.*, 2012). De sublinhar, no entanto, que o uso de contraceptivos orais diminui o risco de cancro do ovário (Fairfield *et al.*, 2001).

Acredita-se que a obesidade e a ingestão de álcool conferem também risco aumentado para desenvolver cancro da mama após a menopausa, enquanto a

atividade física é provavelmente protetora (Pischon *et al.*, 2008). No que respeita ao uso do tabaco, não se verificou associação entre o seu consumo e o risco de cancro da mama (Lorincz e Sukumar, 2006).

Está também documentada uma maior incidência de cancro da mama em mulheres que estiveram expostas a radiações, nomeadamente as que tiveram doença de Hodgkin e foram tratadas com radioterapia, sobretudo antes dos 20 anos de idade (Korde *et al.*, 2004; Veronesi *et al.*, 2005).

1.1.3. Fatores de risco de cancro do ovário

Relativamente ao cancro do ovário, têm sido apontados a dieta (Fairfield *et al.*, 2001) e o estilo de vida ocidental, em particular a obesidade, como fatores de risco para desenvolver esta neoplasia (Calle *et al.*, 2003).

As mulheres com história familiar de cancro da mama têm um risco aumentado de desenvolver esta neoplasia. O risco de desenvolver cancro do ovário é bastante superior em mulheres com história familiar da doença. Com efeito, na população em geral é de 1,6%, atinge os 5% em mulheres com um familiar em 1º grau afetado e os 7% no caso de dois familiares em 1º grau afetados (Pharoah *et al.*, 2002). Este risco associado ao historial familiar poderá estar associado a alterações genéticas em genes de suscetibilidade para cancro da mama e cancro do ovário.

1.2. Genética do cancro e Predisposição hereditária

O cancro ocorre quando existe a acumulação de várias mutações genéticas em genes críticos. Na maior parte dos casos (cancro esporádico), estas alterações, chamadas mutações somáticas, não são herdadas e estão presentes apenas no tecido tumoral pois têm causa espontânea (Osborne *et al.*, 2004). Menos comum, nos casos de cancro hereditário de causa genética, verificam-se alterações genéticas herdadas dos pais, que aumentam o risco do desenvolvimento de cancro. Estas alterações estão presentes num determinado gene, por exemplo um dos BRCA's, e estão presentes em todas as células do

organismo, muito embora apenas aumentem a predisposição para o cancro em tecidos específicos. A estas mutações dá-se o nome de mutações germinativas.

Nestes casos, são necessárias mutações somáticas adicionais noutros genes para que se verifique o desenvolvimento do cancro. A presença de mutações germinativas em genes de suscetibilidade tumoral (particularmente os relacionados com a reparação do ADN) facilita a acumulação de mutações somáticas e, portanto, a carcinogénese (Osborne *et al.*, 2004). Para além da maior incidência de cancro verificada nos indivíduos portadores de mutações germinativas em genes de suscetibilidade, é de registar uma idade média mais jovem no diagnóstico, bem como a ocorrência frequente de múltiplos tumores primários (Fearon *et al.*, 1997).

Assim, tanto o diagnóstico de cancro em idade jovem, como a ocorrência de tumores múltiplos, representam critérios de suspeição de cancro hereditário.

No modelo de carcinogénese, tanto do cancro esporádico, bem como do cancro familiar, são particularmente relevantes as influências de duas grandes categorias de genes, os oncogenes e os genes supressores tumorais (Osborne *et al.*, 2004).

1.2.1. Oncogenes

Em condições normais, os proto-oncogenes estimulam o crescimento e diferenciação celulares consoante as necessidades do tecido onde se encontram inseridos. Quando mutados, são ativados de forma imprópria e podem tornar-se em genes cancerígenos, denominados oncogenes. Neste estado de ativação podem induzir um crescimento ou proliferação celulares anormais, mesmo na ausência de fatores de crescimento. A ativação de um proto-oncogene para oncogene exerce um controlo regulatório positivo na célula. Este ganho de função é visto como dominante. Até hoje foram identificados mais de 100 proto-oncogenes. A ativação dos oncogenes pode ocorrer através de diferentes processos, nomeadamente, amplificação génica (como documentada, por exemplo para os genes MYCN e ERBB2), mutação pontual (por exemplo no caso do gene KRAS) e translocação cromossómica, originando genes de fusão com função alterada (por exemplo BCR-ABL) (Osborne *et al.*, 2004).

As mutações hereditárias neste tipo de genes são, no entanto, raras, tendo em conta que a característica dominante destes genes dita, na presença de uma mutação, um crescimento celular descontrolado na embriogénese, levando, presumivelmente, a aborto espontâneo na maioria dos casos (Frank, 2001).

Apenas três oncogenes foram relacionados com síndromes hereditárias, o gene RET (cancro da tiróide associado à Síndrome MEN2A), o gene CDK4 (melanoma hereditário) e o gene MET (carcinoma papilar renal hereditário) (Zuo *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997).

1.2.2. Genes supressores tumorais

Os genes supressores tumorais regulam negativamente a proliferação celular, quer seja controlando a divisão celular, quer promovendo a morte celular programada (apoptose). São genes com um comportamento recessivo.

Originalmente acreditava-se ser necessário que ambos os alelos estejam mutados para que ocorra inativação completa da função do gene (Knudson, 1971).

Embora este seja o mecanismo aceite, estudos sugerem uma “haplo-insuficiência” num largo número de genes supressores tumorais estudados (Fero *et al.*, 1998; Venkatachalam *et al.*, 1998; Kwabi-Addo *et al.*, 2001) incluindo os genes BRCA1 e BRCA2 (Buchholz *et al.*, 2002), indicando que a inativação bi-alélica destes genes pode não ser necessária pelo menos para a iniciação da tumorigénese e que quando existe apenas um alelo que se encontra mutado, a expressão génica destes genes pode ser afetada.

A maior parte das síndromes hereditárias de cancro são devidas a alterações de genes supressores tumorais.

Esta classe de genes subdivide-se em duas subclasses principais: os “*caretakers*” e os “*gatekeepers*”:

Os genes supressores tumorais “*caretakers*” caracterizam-se pela sua função de reparação de erros de replicação no ADN, atuando indiretamente na carcinogénese quando inativados. Quando estes genes se encontram mutados, conferem um fenótipo de instabilidade genómica devido ao aumento da taxa de

mutações, algumas das quais possivelmente ativadoras de oncogenes e outras inativando genes supressores tumorais, podendo as células com essas variantes génicas sofrer seleção clonal (Osborne *et al.*, 2004; Levitt e Hickson, 2002).

Consideram-se “*gatekeepers*” os genes supressores tumorais “clássicos”, isto é, os que atuam diretamente, por exemplo, na regulação da proliferação celular, sendo portanto limitadores da tumorigénese (Levitt e Hickson, 2002).

1.3. Genética do cancro da mama

1.3.1. Relevância dos genes BRCA1 e BRCA2 no cancro da mama

As mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2 são a causa mais frequente do aparecimento de HBOC. Estas mutações apresentam um padrão de transmissão autossómico dominante.

De todos os casos de cancro da mama e ovário, estima-se que 5 a 10% representem cancros familiares e, pelo menos metade desses, sejam originados por mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2 (Claus *et al.*, 1996; Ford *et al.*, 1998; Antoniou *et al.*, 2010)

Em pacientes portadores de mutação patogénica, os genes BRCA1 e BRCA2 apresentam penetrância incompleta (Szabo e King, 1995). De fato, o risco de desenvolver um cancro de mama até aos 70 anos é de aproximadamente 65% e 50% em portadores de mutação patogénica no gene BRCA1 e BRCA2, respetivamente, apesar de serem encontradas estimativas maiores ou menores em séries diferentes (Antoniou *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2007). Por sua vez, o risco de desenvolver um cancro de ovário aos 70 anos (incluindo carcinomas peritoneais e das trompas de Falópio) é estimado em cerca de 40% e 20% em portadores de mutações patogénicas no gene BRCA1 e BRCA2, respetivamente (Chen *et al.*, 2007; Antoniou *et al.*, 2010), com as mesmas ressalvas atrás mencionadas. As causas para esta variabilidade da penetrância ainda não estão completamente esclarecidas (Gayther *et al.*, 1995 e 1997; Antoniou *et al.*, 2010).

Enquanto no gene BRCA1 a homozigotia para mutações patogénicas é sempre letal durante a embriogénese (D’Andrea *et al.*, 2007), para o gene BRCA2

está descrito que mutações patogénicas em ambos os alelos podem estar na origem da anemia de Fanconi ou ser causa de morte durante o período embrionário (D'Andrea *et al.*, 2007).

Algumas características do próprio cancro podem sugerir qual o gene BRCA envolvido. Tipicamente, o cancro de mama em portadores de mutação patogénica no gene BRCA1 é um carcinoma ductal invasor de alto grau nuclear e histológico, elevada proliferação, é do tipo “triplo negativo” (negativo para a expressão de recetor de estrógeno (ER), recetor de progesterona (PR) e Her2/neu (Her2)) (The Breast Cancer Linkage Consortium 1997; Johannsson *et al.*, 1997) e apresenta “sobre-expressão” da proteína TP53 (Honrado *et al.*, 2006).

O cancro da mama associado a mutações patogénicas no gene BRCA2 possui maioritariamente morfologia e expressões de ER e PR semelhantes às encontradas no cancro esporádico, sendo também predominantemente um carcinoma ductal invasor (Honrado *et al.*, 2006; Lakhani *et al.*, 1998; Sobol *et al.*, 2001). A “sobre-expressão” de Ciclina D1, CDK4 e outras Quinases dependentes de Ciclina (CDK's) (p16, p21 e p27) é frequente nos cancros associados a mutação do BRCA2 (Honrado *et al.*, 2006).

Existem outras síndromes que conferem também um risco aumentado de desenvolver cancro da mama, sendo, no entanto, causas menos frequentes da doença, nomeadamente: Síndrome de Li-Fraumeni (causado por mutações patogénicas no gene TP53), Síndrome de Cowden (causado por mutações patogénicas no gene PTEN) e a Síndrome de Peutz-Jeghers (causado por mutações patogénicas no gene STK11) (Campeau *et al.*, 2008). Estas síndromes, no entanto, caracterizam-se por risco aumentado de cancro noutras localizações (por exemplo cancro do colon no caso da Síndrome de Peutz-Jeghers; sarcomas no caso da Síndrome de Li-Fraumeni).

1.3.2. O gene BRCA 1

O gene BRCA1 foi sequenciado por Hall e colaboradores em 1990 a partir de estudos de *linkage* (ligação genética) envolvendo famílias com vários casos de cancro da mama, tendo sido clonado e caracterizado em 1994 por Miki e colaboradores. Este gene é um supressor tumoral “*caretaker*” que tem como principal função a reparação de ADN por excisão de nucleotídeos. Está também envolvido na regulação dos pontos de controlo do ciclo celular, ubiquitinação de proteínas, remodelamento da cromatina e silenciamento do cromossoma X (Buller *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1999; Bochar *et al.*, 2000; Le Page *et al.*, 2000; Hatman e Ford, 2002).

Localizado no cromossoma 17 (17q12-q21), a sua região codificante de 5592 pares de bases está dividida em 22 exões (excluindo os exões 1 e 4 que não são traduzidos), que codificam uma proteína de 1.864 aminoácidos.

A proteína BRCA1 é constituída por vários domínios com funções distintas (Figuras 2 e 3), nomeadamente: um domínio “*RING finger*”, importante para a atividade de degradação da via ubiquitina-ligase e interação com outras proteínas na porção amino-terminal); dois domínios de localização nuclear, importantes para a interação com proteínas do controlo do ciclo celular (como a p53); um domínio de ligação ao ADN; uma região SCD (*cluster* de serinas e treoninas) e, na porção carboxi-terminal, dois domínios BRCT (BRCA1 C_Terminal Domain), importantes para a manutenção da estabilidade da proteína e dos processos de transcrição celular (Wu *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; Yarden *et al.*, 2002; Narod e Foulkes, 2004; Deng e Brodie, 2000).



Figura 2 - Estrutura da proteína BRCA1

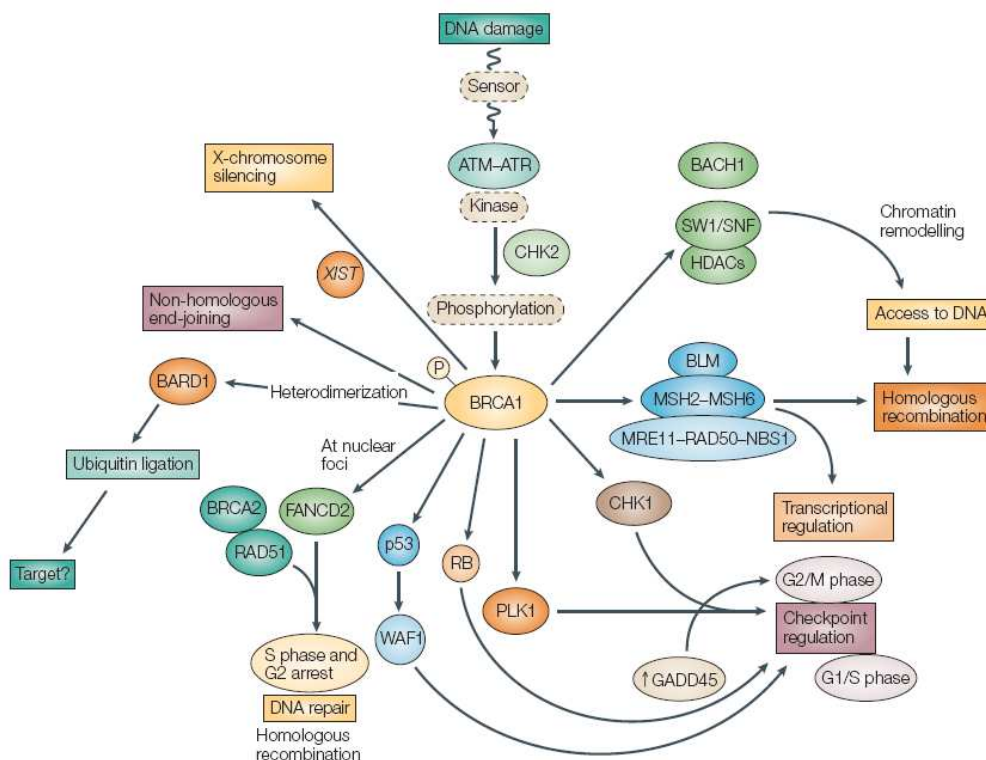


Figura 3 - Esquema representativo das diferentes interações da proteína BRCA1 e funções celulares em que está envolvida (adaptado de Narod e Foulkes, 2004).

1.3.3. O gene BRCA 2

O gene BRCA2, foi sequenciado em 1994 e 1995 por Wooster e colaboradores e caracterizado no ano seguinte por Tavtigian e colaboradores. O BRCA2 é um gene supressor tumoral “*caretaker*” essencial para a atividade de recombinação homóloga, checkpoint mitótico e é também responsável pela localização do centrôssoma durante a citocinese, mostrando a sua grande importância na manutenção da estabilidade genômica (Bignell *et al.*, 1997; Milner *et al.*, 1997; Blackshear *et al.*, 1998; Narod e Foulkes, 2004).

Localizado no cromossoma 13 (13q12-q13), a sua região codificante de 10.254 pares de base está dividida em 26 exões (excluindo o exão 1 que não é traduzido), que codificam uma proteína de 3.418 aminoácidos.

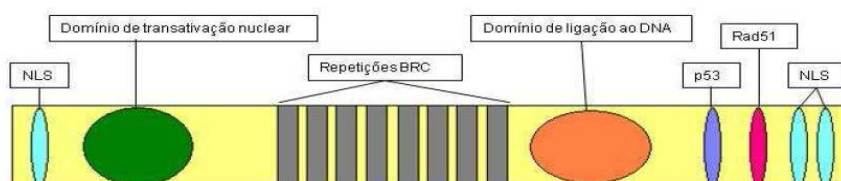


Figura 4 – Estrutura da proteína BRCA2

A figura 4 esquematiza a estrutura da proteína BRCA2. Na região N-terminal há um sinal de localização nuclear e um domínio de transativação. Adjacentes a esta região, encontram-se oito repetições BRC (BRC “*repeats domain*”), responsáveis pela interação com a proteína Rad51 e um domínio de ligação ao ADN. Na região terminal, existem dois domínios de ligação à p53 e

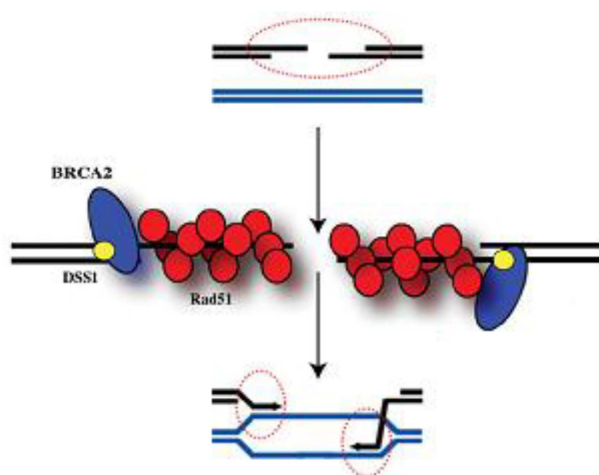


Figura 5 - Modelo representativo da ação da proteína BRCA2 na reparação das quebras da cadeia dupla de ADN por recombinação homóloga (adaptado de Boulton *et al.*, 2006).

seguinte-se a ligação do complexo BRCA2-DSS1 à junção ssADN/dsADN, facilitando a ligação da Rad51 à extremidade ssADN, formando um fragmento nucleoproteico. A Rad51, tendo como molde um cromossoma homólogo, forma uma ansa e catalisa a junção das cadeias para que se processe a reparação por recombinação homóloga (Boulton *et al.*, 2006) (Figura 5).

Quando existe inativação do gene BRCA2, as células ficam dependentes de formas menos eficientes de reparação (Recombinação não homóloga e “*single strand annealing*”) originando um aumento da probabilidade de acumulação de erros de replicação do ADN no processo mitótico (Turner *et al.*, 2004).

1.4. Mutações dos genes BRCA1 e BRCA2

1.4.1. Prevalência de mutações patogénicas em diferentes raças/etnias

Em 2009, Hall e colaboradores estudaram uma amostra de 46.276 mulheres que preenchiam os requisitos para o estudo dos genes BRCA1 e BRCA2, provenientes de várias populações diferentes. Foram identificadas mutações patogénicas em 12,5% das mulheres e mutações patogénicas recorrentes (prevalência > 2%) foram identificadas em todos os grupos populacionais. As mulheres estudadas de descendência não-Europeia eram de idade mais jovem (idade média: 45,9 anos) do que as mulheres europeias (idade média: 50 anos). Mulheres de ascendência Africana e de ascendência Latino-americana tinham uma prevalência significativamente maior de mutações

| Ethnicity | No. | Deleterious Mutations | | | | VUS | |
|------------------|--------|-----------------------|------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | | No. (% Row) | | | OR [95% CI]† | No. (% Row) | OR [95% CI]† |
| | | BRCA1 | BRCA2 | Total* | | | |
| Western European | 36,235 | 2501 (6.9) | 1899 (5.2) | 4400 (12.1) | Referent | 2081 (5.7) | Referent |
| Central European | 4066 | 336 (8.3) | 214 (5.3) | 550 (13.5) | 1.1 [1.0-1.2] | 231 (5.7) | 1.0 [0.9-1.1] |
| Latin American | 1936 | 185 (9.6) | 105 (5.4) | 290 (14.8) | 1.2 [1.1-1.4] | 195 (10.1) | 1.8 [1.6-2.2] |
| African | 1767 | 180 (10.2) | 100 (5.7) | 280 (15.6) | 1.3 [1.1-1.5] | 292 (16.5) | 3.2 [2.8-3.7] |
| Asian | 1183 | 75 (6.3) | 75 (6.3) | 150 (12.7) | 1.0 [0.9-1.2] | 161 (13.6) | 2.6 [2.2-3.1] |
| Native American | 597 | 44 (7.4) | 35 (5.9) | 79 (13.2) | 1.1 [0.9-1.4] | 41 (6.9) | 1.2 [0.9-1.7] |
| Middle Eastern | 492 | 30 (6.1) | 16 (3.3) | 46 (9.4) | 0.7 [0.5-1.0] | 55 (11.2) | 2.1 [1.6-2.7] |
| Total | 46,276 | 3351 (7.2) | 2444 (5.3) | 5795 (12.5) | — | 3057 (6.6) | — |

VUS indicates variants of uncertain significance; BRCA1, breast cancer gene 1; BRCA2, breast cancer gene 2; OR, odds ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

*Fifteen individuals carried a mutation in both BRCA1 and BRCA2 (11 Western Europeans, 3 Latin Americans, and 1 African).

†Data are reported as univariate ORs and are age-adjusted.

Tabela 1 - Expressão estatística das mutações patogénicas em diferentes populações (Hall *et al.*, 2009)

patogénicas nos genes BRCA1 e BRCA2 em comparação com mulheres de ascendência europeia ocidental (15,6% e 14,8% respetivamente versus 12,1%) (Tabela 1). Este estudo revelou uma grande quantidade de variantes intrónicas, mutações missense ou mesmo silenciosas sem significado clínico conhecido, algumas das quais não anteriormente citadas na literatura (Hall *et al.*, 2009).

1.4.2. Prevalência de mutações patogénicas na população portuguesa

Em Portugal, Peixoto e colaboradores, identificaram 22 pacientes com mutações patogénicas numa coorte de 100 pacientes índice, o que traduz uma prevalência de mutações patogénicas de 22% (Peixoto *et al.*, 2006).

Em 2008, Peixoto e colaboradores realizaram um novo estudo que colmatou uma importante falha do primeiro estudo por eles realizado, procurando especificamente a mutação fundadora portuguesa c.156_157insAlu na amostragem do estudo anterior nos doentes em que não tinha sido encontrada mutação comprovadamente patogénica. Neste estudo, a referida mutação foi encontrada em 8 casos o que aumentou a prevalência de mutações patogénicas relativamente ao estudo anterior, de 22% (22/100) para 30% (30/100) (Peixoto *et al.*, 2008).

Em dois estudos anteriores, realizados também em doentes portugueses, a média da prevalência de mutações patogénicas foi de 6,5% (Soares *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2002).

A mutação fundadora típica da população portuguesa no gene BRCA2, c.156_157insAlu, foi inicialmente descrita em 2007 por Machado e colaboradores (Machado *et al.*, 2007), tendo Peixoto e colaboradores observado uma prevalência de 8% (8/100) desta mutação na amostra por eles estudada, correspondente a 27% (8/30) de todas as mutações patogénicas encontradas nesse estudo (Peixoto *et al.*, 2008).

1.4.3. Mutações fundadoras

A incidência de mutações patogénicas em famílias de alto risco varia muito entre diferentes populações. Certas mutações podem ser específicas de uma família ou aparecer com elevada frequência em determinados grupos étnicos, sendo designadas de mutações fundadoras (Kuska *et al.*, 1997). Várias mutações fundadoras têm sido descritas na literatura para os genes BRCA1/2 (Sarantaus *et al.*, 2000) (Tabela 2). Exemplos clássicos de mutações fundadoras são as mutações 185delAG e 5382insC no gene BRCA1 e a mutação 6174delT no gene BRCA2, que afetam 2 a 2,5% dos judeus Ashkenazy, apresentando uma frequência 10 a 50 vezes maior do que na população em geral (Friedman *et al.*, 1995; Szabo e King, 1997; Ferla *et al.*, 2007).

De acordo com o estudo feito por Ferla e colaboradores (2007), que compilou todas as mutações fundadoras nos genes BRCA1/2 de populações de todo o mundo, este tipo de mutações parece ocorrer com mais frequência em populações que são geneticamente mais isoladas pela ausência de ambientes multiculturais. No estudo de Ferla não está incluída a mutação fundadora portuguesa (Ferla *et al.*, 2007).

1.5. Identificação de pacientes com predisposição hereditária ao cancro

Desde a descoberta da associação dos genes BRCA1/2 ao cancro hereditário da mama/ovário, cresceu o interesse na identificação de pacientes com predisposição para este tipo de cancro.

Os critérios de seleção de pacientes para o estudo genético dos genes BRCA1 e BRCA2 utilizados, baseiam-se sobretudo na quantidade de familiares afetados com cancro da mama e/ou ovário, no seu grau de parentesco relativamente ao indivíduo em estudo, na existência de outros tumores e na idade ao diagnóstico das neoplasias. Estão descritas várias *guidelines* para o recrutamento de doentes para estudo genético dos genes BRCA1 e BRCA2. Por exemplo, foram publicadas em 2009 e revistas em 2012 pela National Comprehensive Cancer Network (NCCN), no estudo “*Genetic/Familial High-Risk*

Tabela 2 - Mutações fundadoras dos genes BRCA1 e BRCA2 em diferentes populações (adaptado de Ferla *et al.*, 2007)

| Population | Mutation BRCA1 | BRCA2 |
|------------------------------|---|---------------------------------|
| Ashkenazi Jews | 185delAG 5832insC | |
| Icelanders | | 6174delT 995delG |
| Norwegians | 1675delA 816delGT 3347delAG 1135insA | |
| Finns | IVS11 + 3A>G | 9345 + 1G>A C7708T T8555G |
| Swedes | 3171ins5 | |
| French | 3600del11 | |
| Dutch | 2804delAA IVS12-1643del3835 | 5579insA 6503delTT |
| Italians (Calabria) | 5083del19 | |
| Italians (Sardinia) | | 8765delAG |
| French-Canadians (Quebec) | C4446T | 8765delAG 3398delAAAAG |
| Hispanics (South California) | R1443X S995X 2552delC | |
| Hispanics (Columbia) | 3450delCAAG A1708E | 3034delACAA |
| Afro-Americans | 943ins10 1832del5 5296del4 | IVS13 + 1G>A |
| South Africans | E881X | |
| Iraqi/Iranian Jews | Tyr978X | |
| Chinese | 1081delG | |
| Japanese | Q934X L63X | 5802delAATT |
| Malaysians | 2846insA | 4265delCT 4859delA |
| Filipinos | | |
| Pakistanis | 5454delC S1503X R1835X | |

Assessment: Breast and Ovarian”, as seguintes, onde se recomenda que os candidatos ao teste genético tenham de cumprir uma ou mais das seguintes premissas para serem submetidos a teste genético dos genes BRCA1 e BRCA2 (NCCN, 2012);

- ✓ Cancro da mama diagnosticado antes dos 45 anos;
- ✓ Cancro da mama diagnosticado antes dos 50 anos e pelo menos um familiar diagnosticado com cancro da mama antes dos 50 anos ou pelo menos um familiar direto com cancro do ovário;
- ✓ Dois cancros da mama primários e pelo menos um deles diagnosticado antes dos 50 anos;
- ✓ Pelo menos dois familiares diretos com cancro da mama/ovário;
- ✓ Um familiar masculino com cancro da mama;
- ✓ História pessoal de cancro do ovário;
- ✓ Pertença a grupos étnicos associados a prevalência elevada de mutações nos genes BRCA1/BRCA2.

Para além destas *guidelines*, outras são descritas para populações em específico, como é o exemplo da VI Reunião de Consenso Nacional do Cancro da Mama em Portugal, decorrida no Luso, no ano de 2008, que definiu critérios semelhantes aos da NCCN mas adaptados à realidade da população portuguesa (VI Reunião de Consenso Nacional do Cancro da Mama em Portugal, 2008).

Existem ainda várias guias e ferramentas que ajudam a determinar a probabilidade da existência de uma mutação patogénica num indivíduo, que juntam vários algoritmos de cálculo matemático complexos, uns baseados no historial de cancro na família do paciente em estudo e outros no próprio historial pessoal em que o tipo de cancro e a sua agressividade assumem um papel preponderante no cálculo. São de referir o BRCAPro®, o programa Myriad® e o Boadicea®, todos com os seus pontos-fortes e desvantagens, quer na eficácia de análise, quer na facilidade de utilização. (*Parmigiani et al.*, 1998; *Berry et al.*, 2002; *Schneegans et al.*, 2012). Em Portugal, o programa BRCAPro® é provavelmente o mais utilizado na avaliação de famílias com cancro da mama.

O BRCAPro® é um modelo estatístico associado a um *software* (Cancer Gene) que utiliza uma abordagem Mendeliana e Bayesiana para presumir uma transmissão autossômica dominante (*Berry et al.*, 2002; *Parmigiani et al.*, 1998). A penetrância e a prevalência, dependentes da idade do indivíduo a ser testado, são assumidas a partir de uma revisão sistemática da literatura. Este modelo determina a probabilidade de um indivíduo ser portador de mutação germinativa patogénica nos genes BRCA1 e BRCA2 a partir do histórico pessoal e familiar de cancro de mama e/ou ovário do(a) paciente, incluindo cancro da mama no sexo masculino e cancro de mama bilateral no indivíduo ou noutros membros da família.

1.6. Prevenção e Tratamento do cancro familiar hereditário (HBOC)

A identificação de pacientes com alto risco torna-se essencial quando se observa que um rastreio de mutações e estratégias de prevenção precoces reduzem a morbilidade e mortalidade associada ao cancro da mama/ovário. As mulheres com mutações patogénicas nos genes BRCA1/2 devem ser vigiadas clínica e imagiologicamente com muita regularidade para que se possa fazer um diagnóstico precoce de cancro da mama e consequentemente aumentar significativamente as hipóteses de cura.

Nestes casos o seguimento deve iniciar-se logo aos 25 anos de idade. As recomendações do NCCN em 2009 incluem mamografia anual, Ressonância Magnética, exame clínico por parte do médico duas vezes por ano e um autoexame todos os meses. Um dos temas mais debatidos neste âmbito decorre do fato de alguns médicos defenderem que a mamografia poderá aumentar o risco de cancro, tendo em conta que os genes BRCA1/2 são genes de reparação de quebras duplas no ADN, e poderão estar parcialmente inativos em portadores de mutação patogénica, devido ao possível efeito de “haplo-insuficiência” já falado anteriormente. Estas quebras podem teoricamente ser induzidas pela radiação emitida pela mamografia, o que poderá aumentar a suscetibilidade para o desenvolvimento de cancro. Não existe até agora evidência que comprove, na

prática, a existência deste risco, pelo que se aceita haver uma relação custo/benefício favorável deste exame, que continua a ser recomendado.

Em todo o caso, a Ressonância Magnética representa provavelmente um exame mais sensível na deteção de cancro da mama, ainda que menos específico (Leach *et al.*, 2005; Kuhl *et al.*, 2010; Rijnsburger *et al.*, 2010).

Relativamente ao cancro do ovário, não existe ainda nenhum método eficaz de rastreio, embora se recomende que portadores de mutação patogénica no BRCA1 ou BRCA2 façam uma ecografia transvaginal duas vezes por ano e comecem a fazer o doseamento sérico do marcador CA-125 a partir dos 30 anos, também duas vezes por ano, a menos que optem por salpingo-ooforectomia bilateral profilática (Van der Velde *et al.*, 2009).

Existem algumas estratégias preventivas mais radicais para portadores de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, tal como a cirurgia redutora de risco (ou profilática), que é o método mais invasivo para o paciente mas é também o mais eficiente na redução do risco nestes pacientes. A mastectomia bilateral (remoção de ambas as mamas) reduz o risco de cancro da mama em cerca de 90% (Hartmann *et al.*, 2001; Meijers-Heijboer *et al.*, 2001; Kaas *et al.*, 2010; Domchek *et al.*, 2010).

Nalguns estudos, a salpingo-ooforectomia bilateral (remoção dos ovários e trompas de Falópio) mostrou diminuir o risco de cancro da mama em 50% (particularmente nos casos de mutação patogénica no gene BRCA2) e cancro do ovário em 85% (Domchek *et al.*, 2010).

Relativamente ao tratamento, a quimioterapia em pacientes com mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 com cancro é similar aos pacientes com cancro esporádico, mas alguns estudos in-vitro sugerem um aumento de sensibilidade a derivados de platina e diminuição de sensibilidade a taxanos (Bordeleau *et al.*, 2010; Tutt *et al.*, 2010).

1.7. Técnicas para *rastreio* de mutações nestes genes

Se é certo que as discrepâncias observadas entre taxas de prevalência de mutações dos genes BRCA1 e BRCA2 em doentes com cancro da mama/ovário se deve, em grande parte, à aplicação de critérios distintos de recrutamento de pacientes para estudo genético, esse poderá não ser o único fator a contribuir para esta variabilidade. Com efeito, a diversidade de técnicas (e respetivas sensibilidades) utilizadas para a deteção das mutações destes genes, também pode contribuir para essa variabilidade. De entre as mais usadas, constam a sequenciação direta, o *Protein Truncation Test* (PTT), o *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), o *Denaturing High Pressure Liquid Chromatography* (DHPLC), o *Single-Strand Conformation Polymorphism* (SSCP) e alguns métodos complementares que, quando utilizados em conjunto com os anteriormente referidos, aumentam a taxa de deteção de alterações germinativas, como é exemplo o MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (Tabela 4).

O DGGE, a técnica utilizada neste trabalho, é uma técnica com uma ótima relação custo benefício, com aproximadamente a mesma taxa de deteção da sequenciação direta, alta sensibilidade, e bastante menos oneroso do que a sequenciação direta, embora, tal como esta, não permita a deteção de grandes rearranjos genómicos. Embora seja uma técnica de trabalho e análise intensivos, provou ser tão rápida quanto a sequenciação. Em 2006, Bellosillo e Tusquets, demonstraram a utilidade do MLPA, que quando usado em conjunto com outra técnica de rastreio de mutações pontuais (como o DGGE) pode detetar até 95% das alterações (Bellosillo e Tusquets, 2006). A importância da técnica MLPA (ou outra equivalente) para o estudo dos genes BRCA1 e BRCA2 é bem ilustrada por vários estudos que mostraram que uma percentagem significativa de casos sem mutações pontuais detetadas nestes dois genes, apresentavam afinal grandes rearranjos genómicos patogénicos (Petrij-Bosch *et al.*, 1997; Walsh *et al.*, 2006; Meindell *et al.*, 2008). O gene BRCA1 pode apresentar grandes rearranjos entre 7 e 40% dos casos, enquanto para o gene BRCA2, essa frequência é menor situando-se entre 2 e 8% (Hogervorst *et al.*, 2003; Montagna *et al.*, 2003; Casilli *et al.*, 2006).

Tabela 3 - Exemplos de técnicas utilizadas para rastreamento dos genes BRCA1 e BRCA2

| Mutações pontuais | | Grandes Rearranjos Genômicos | |
|--|------------------------------|---|-------------------|
| Técnica: | Taxa de detecção: | Técnica: | Taxa de detecção: |
| Direct Sequencing | 85% (95% com MLPA e/ou PTT) | Multiplex ligation-dependent probe amplification - MLPA | (não definida) |
| Protein Truncation Test - PTT | 82,6% | | |
| Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - DGGE | ~85% (95% com MLPA e/ou PTT) | | |
| Denaturing High Pressure Liquid Chromatography - DHPLC | ~86% | | |
| Next-Generation Sequencing | (não definida) | | |

OBJETIVOS

2. Objetivos do estudo

As mutações nos genes BRCA1/2 são responsáveis por cerca de 50% dos casos de cancro da mama e/ou ovário hereditário. Atualmente pouco se conhece acerca do perfil de mutações destes genes na população portuguesa, com exceção da mutação fundadora portuguesa (inserção ALU no gene BRCA2). Sendo assim, os objetivos deste estudo foram:

- ✓ Pesquisa e caracterização de alterações de sequência dos genes BRCA1/2, na população de doentes com cancro da mama estudados no GDPN em 2009, com indicação para teste genético.
- ✓ Pesquisa de mutações recorrentes (*hotspots*) dos genes BRCA1 e BRCA2, que permitam fazer um rastreio inicial das mesmas.
- ✓ Comparação da frequência da mutação fundadora portuguesa com a de outras mutações.
- ✓ Comparação da prevalência das mutações patogénicas nesta amostra com a de outros estudos.
- ✓ Avaliação do desempenho do programa BRCAPro®, como instrumento de seleção de doentes para estudo genético na amostra estudada

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1. Seleção de casos

Para a pesquisa e caracterização de alterações de sequência dos genes BRCA1/2, a amostra foi constituída por uma série consecutiva de 121 casos de pacientes afetados por cancro da mama e/ou ovário em seguimento clínico ou em tratamento por hormonoterapia, independentemente da presença de doença ativa, que deram entrada no GDPN no ano de 2009, para estudo genético dos genes BRCA1 e BRCA2. Apresentavam idades compreendidas entre os 22 e os 74 anos, (idade média ao diagnóstico de 45,1 anos) e cumpriam os requisitos de seleção do NCCN para estudo genético. Destes, 48 tinham dois ou mais familiares com cancro da mama diagnosticado antes dos 50 anos, 8 tinham familiares com cancro da mama (<50 anos) e cancro do ovário, 53 cancro da mama diagnosticado antes dos 45 anos, 3 cancro da mama diagnosticado antes dos 45 anos e cancro do ovário e 9 casos com cancro da mama bilateral.

Para a avaliação do desempenho do programa BRCAPro® selecionaram-se 15 casos com marcada incidência familiar, já estudados no GDPN para os genes BRCA1 e BRCA2, para os quais nos foi facultada a árvore genealógica completa.

Para a realização do teste genético de cada paciente foi colhido sangue periférico em tubos com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), do qual foi posteriormente extraído ADN.

MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e métodos

Para a pesquisa e caracterização de alterações de sequência dos genes BRCA1/2, foi realizado o seguinte protocolo de forma sequencial:

Inicialmente foi pesquisada a inserção Alu (c.156_157insAlu) no gene BRCA2 segundo as condições descritas no artigo de Peixoto e colaboradores, publicado em 2008 (Peixoto *et al.*, 2008). Nos casos em que foi detectada a inserção, o estudo das regiões codificantes dos genes BRCA1 e BRCA2 não foi efetuado. Nos casos negativos para a presença da inserção Alu (c.156_157insAlu), procedeu-se à pesquisa de mutações pontuais em toda a região codificante do gene.

Para a pesquisa das regiões codificantes e transições intrão/exão dos genes BRCA1 e BRCA2, utilizou-se o seguinte protocolo:

- PCR para amplificação das regiões de interesse dos genes BRCA1 e BRCA2.
- Eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação
- Reação de formação de Heteroduplexes dos produtos de amplificação e das misturas de polimorfismos
- Agrupamento de fragmentos em *pools* e corrida em gel de DGGE
- Coloração dos géis de DGGE com Brometo de Etídio
- Análise dos géis de DGGE
- Sequenciação dos fragmentos que apresentem um padrão de migração eletroforético anormal.

Os 22 e 26 exões (e respectivas transições intrão-exão) dos genes BRCA1 e BRCA2, respetivamente, foram amplificados por PCR com *primers* específicos (em Anexo 6). Em ambos os genes, alguns exões foram subdivididos em 2 ou mais fragmentos devido ao seu grande tamanho.

O rastreio de mutações pontuais nos genes BRCA1 e BRCA2 foi realizado através da técnica DGGE, à exceção dos exões 9 e 10 que foram analisados por

sequenciação direta, devido à dificuldade de análise destes fragmentos em gel de DGGE.

Após a análise dos géis de DGGE, sempre que foi encontrado um algum padrão aberrante, comparativamente ao mesmo fragmento noutros casos, efetuou-se uma nova amplificação do fragmento correspondente e sequenciação pelo método de *Sanger* para confirmação da presença de alguma alteração de sequência. A sequenciação foi feita em ambos os sentidos (5'→3' e 3'→5').

4.1. Extração de ADN a partir de Sangue Periférico

Extraiu-se ADN a partir de 1200µl de sangue periférico total após colheita em tubos de 10ml com EDTA. A extração de ADN foi feita com o *kit* de extração QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), devidamente otimizado para o extrator automático QIAcube® (Qiagen, Hilden, Germany).

4.2. Quantificação do ADN extraído

Após extração do ADN procedeu-se à quantificação por espectrofotometria no espectrofotómetro *SmartSpec Plus Spectrophotometer* (Biorad, #170-2525). A leitura foi definida para os parâmetros “*Double Stranded DNA*”, com fator de conversão 50, lido a 260 nm, tendo como referência que uma unidade de densidade ótica a 260 nm corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de ADN de cadeia dupla. Seguiu-se o seguinte protocolo:

- Pipetaram-se 50µl de H₂O bi-destilada e bi-desionizada para uma cuvete nova. A cuvete foi colocada no aparelho e foi definido o valor para o “branco”.
- De seguida numa nova cuvete pipetou-se 48 µl de H₂O e 2 µl do ADN a quantificar (Fator de diluição 1/25).
- Após leitura foi registado o valor da quantidade de ADN.

4.3. Amplificação das regiões codificantes e transições intrão/exão dos genes BRCA1 e BRCA2

A amplificação de toda a região codificante e zonas de transição intrão/exão dos genes BRCA1 e BRCA2 foi efetuado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) usando *primers* a “flanquear” as zonas de interesse, previamente descritos por Van der Hout em 2006 (Van der Hout *et al.*, 2006) (Anexo 6). Todos os *primers* encontravam-se guardados em *stock* a uma concentração de 100 pmol/ μ l (-20°C) e com alíquotas de trabalho de 200 μ l a uma concentração a 3pmol/ μ l (-20°C).

A amplificação ocorreu com recurso a um Termociclador *GeneAmp®* PCR System 9700 (*Applied Biosystems*, P/N N805-0200), em placas *MicroAmp®* *Optical* 96-Well *Reaction Plate* (*Applied Biosystems*, Cat.No.N8010560), no qual foram distribuídos, por poço, 5 μ l do par de *primers* (2,5 μ l *F* + 2,5 μ l *R*) das alíquotas de trabalho, de acordo com as condições abaixo descritas, com o kit de amplificação Promega *Gotaq®* *Flexi* (cat no.M829) (Anexo 1).

| PCR (x1): | | Stepdown PCR: | |
|----------------|---|---------------|-----------|
| 1 μ l | ADN (~70ng) | 3 min. | 94°C → 1X |
| 6 μ l | Taq Buffer 10X | 1 min. | 94°C |
| 1.8 μ l | MgCl ₂ (25mM) | 1 min. | 52°C |
| 2,5 μ l | <i>Primer</i> Forward (3pmol/ μ l)* | 1 min. | 72°C |
| 2,5 μ l | <i>Primer</i> Reverse (3pmol/ μ l)* | 1 min. | 94°C |
| 1,2 μ l | dNTP's (10mM) | 1 min. | 50°C |
| 0,2 μ l | Taq Polymerase (5 u/ μ l) | 1 min. | 72°C |
| + 14,8 μ l | H ₂ O (B-Braun) | 1 min. | 94°C |
| 30 μ l | | 1 min. | 48°C |
| | | 1 min. | 72°C |
| | | 5 min. | 72°C → 1X |

* *Primers* previamente distribuídos

A amplificação dos fragmentos 21 e 22 efetuou-se num PCR adicional, de acordo com as seguintes condições do *kit* de amplificação AmpliTaq Gold® (Applied Biosystems AmpliTaq Gold® 360 DNA Polymerase, cat no. 4398813):

| PCR: | | Stepdown PCR: | | | |
|-----------------|------------------------------|---------------|------|---|-----|
| 1µl | ADN (~70ng) | 3 min. | 94°C | → | 1X |
| 3µl | Taq Buffer 10X | 1 min. | 94°C | } | 5X |
| 1.8µl | MgCl ₂ (25mM) | 1 min. | 54°C | | |
| 2,5µl | Primer Forward (3pmol/ul) | 1 min. | 72°C | | |
| 2,5ul | Primer Reverse (3pmol/ul) | 1 min. | 94°C | } | 5X |
| 0,8µl | dNTP's (10mM) | 1 min. | 52°C | | |
| 0,34µl | Taq Gold Polymerase (5 u/ul) | 1 min. | 72°C | | |
| <u>+18,06µl</u> | H ₂ O (B-Braun) | 1 min. | 94°C | } | 25X |
| 30µl | | 1 min. | 50°C | | |
| | | 1 min. | 72°C | | |
| | | 5 min. | 72°C | → | 1X |

4.4. Análise qualitativa dos produtos de amplificação

Com o intuito de verificar o sucesso na amplificação dos produtos desejados, fez-se uma eletroforese em gel de agarose a 2,0%, que foi analisada e fotografada num transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Biorad, cat no.170-8170EDU).

4.5. Reação de formação de Heteroduplexes

A técnica DGGE é usada para separação de fragmentos de ADN de acordo com a sua estabilidade e resistência aos agentes desnaturantes presentes num gel de acrilamida. Assim, para se analisar e visualizar a existência de mutações ou alterações num fragmento previamente amplificado, é necessário analisar os

padrões de desnaturação das várias cadeias presentes num produto amplificado (normais VS mutadas) e as suas diferenças de migração num gel de DGGE.

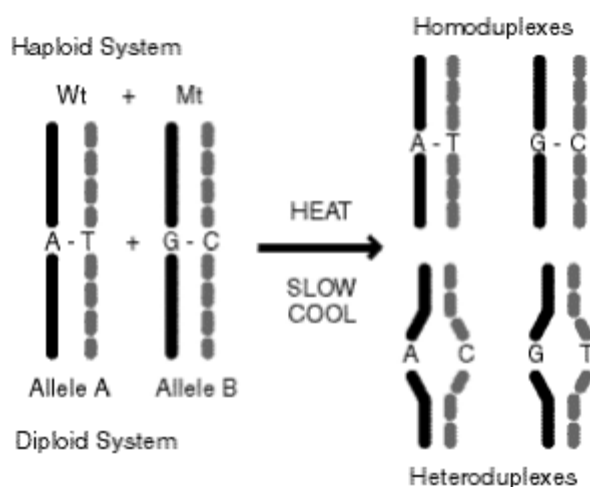


Figura 6- Exemplo de formação de Heteroduplexes em contexto de pesquisa em mutações germinativas

Para promover a detecção de qualquer alteração de sequência nos fragmentos amplificados, estes são submetidos a um programa de formação de heteroduplexes. A desnaturação da cadeia dupla de ADN dos fragmentos amplificados, seguida de uma redução lenta de temperatura, permite que as cadeias renaturem lentamente, com suas ligações permanecendo levemente “relaxadas”.

Nesta etapa, as cadeias podem renaturar formando homoduplexes (cadeias duplas 100% complementares), ou ainda heteroduplexes (cadeias duplas com diferenças conformacionais que não são 100% complementares), caso exista uma mutação em heterozigotia (Figura 6). Esta renaturação incompleta levará à formação de uma “bolha” na zona onde não exista complementaridade entre as bases. Sendo assim, os heteroduplexes permanecem mais fracamente ligados do que os homoduplexes, desnaturando mais facilmente. Tal fará com homoduplexes e heteroduplexes tenham padrões de desnaturação distintos, que darão padrões de análise diferentes no gel de DGGE. Desta forma, cadeias com mutação poderão ser facilmente distinguidas das cadeias sem alteração.

Alguns fragmentos amplificados, foram misturados com fragmentos idênticos de outros casos, que se sabia previamente terem polimorfismo conhecido no fragmento em questão. Posteriormente, submeteram-se todos os produtos amplificados dos genes BRCA1 e BRCA2 e “misturas de polimorfismos” a 95°C durante 10 minutos, com descida de temperatura a 52°C durante 45 minutos.

Este passo de “mistura de polimorfismos” permitiu observar se estávamos na presença de uma amostra com ou sem a presença do polimorfismo associado

à zona amplificada. Caso estivesse presente, teríamos a presença do mesmo padrão de heteroduplexes e homoduplexes (4 bandas) já obtido previamente na amostra conhecida que foi misturada, que se sobreporia a esta. Caso o fragmento estivesse na presença de outra mutação não conhecida, isto levaria à formação de 8 bandas, correspondente a 4 homoduplexes e 4 heteroduplexes, que corresponderiam às várias combinações de emparelhamento das cadeias possíveis na mistura de amostras com as duas alterações [polimorfismo e mutação, só uma alteração (polimorfismo) ou só outra alteração (mutação)].

Na seguinte tabela (tabela 4) estão representados os amplicões que foram misturados com casos com polimorfismos conhecidos.

Tabela 4- Fragmentos com SNP's conhecidos

| Gene | Fragmento | Polimorfismo |
|------------------------|-----------|----------------------|
| BRCA1 | 13 | c.4308T>C (p.S1436S) |
| | 11-3 | c.1067A>G (p.Q356R) |
| | 11-4 | c.1067A>G (p.Q356R) |
| | 16a | c.4837A>G (p.S1613G) |
| | 16b | c.4837A>G (p.S1613G) |
| BRCA1 (Exão 11) | 11-13c | c.3113A>G (p.E1038G) |
| | 11-10 | c.2311T>C (p.L771L) |
| | 11-9 | c.2082C>T (p.S694S) |
| | 11-11 | c.2612C>T (p.P871L) |
| | 11-13f | c.3548A>G (p.K1183R) |
| | 11-12 | c.2612C>T (p.P871L) |
| BRCA2 | 17 | c.7806-14T>C |

| Gene | Fragmento | Polimorfismo |
|------------------------|-----------|----------------------|
| | 2 | c.-26G>A 5'UTR |
| | 14-2 | c.7242A>G (p.S2414S) |
| | 10-2 | c.1114A>C (p.N372H) |
| BRCA2 (Exão 11) | 11-10 | c.3396A>G (p.K1132K) |
| | 11-13 | c.3807T>C (p.V1269V) |
| | 11-12 | c.3807T>C (p.V1269V) |

4.6. Processo de criação de pools de fragmentos

Após a reação de formação de heteroduplexes os fragmentos amplificados foram agrupados em conjuntos (*pools*) de acordo com o seu padrão desnaturante e localização no gel de DGGE. Agruparam-se fragmentos com padrão de desnaturação distante uns dos outros para evitar a sobreposição no gel. Esta ação não interfere com o padrão de desnaturação próprio de cada fragmento, observando-se um padrão de migração igual, quer os fragmentos sejam corridos em *pool* ou isolados. O processo de criação de *pools* foi otimizado de acordo com a distribuição dos amplicões nas placas de amplificação.

Para a criação de cada *pool*, foram retirados 5,5 µl de cada fragmento para um novo tubo de 0,2 ml, de acordo com o anexo 2.

4.7. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)

O protocolo utilizado para criação de géis de DGGE, foi descrito por Van der Hout em 2006 (Van der Hout *et al.*, 2006).

A técnica de DGGE “explora” a diferença na estabilidade do emparelhamento nucleotídico G-C (3 pontes de Hidrogénio) em comparação com o emparelhamento A-T (2 pontes de Hidrogénio). A mistura de fragmentos de

ADN de sequência distinta é separada por eletroforese num gel de acrilamida, contendo um gradiente crescente de agentes desnaturantes de ADN (usualmente a Ureia e Formamida). Regra geral, fragmentos mais ricos em percentagem G-C são mais estáveis (maior número de ligações triplas de Hidrogénio) e permanecem em cadeia dupla até atingirem concentrações desnaturantes mais elevadas. Daí a importância de se efetuar o passo de formação de heteroduplexes, já que cada homoduplex e heteroduplex formado nesse passo, terá uma temperatura de *melting* diferente, apresentando um padrão de desnaturação distinto em gel e permitindo a visualização dos mesmos.

Normalmente, uma sequência rica em GC (conhecida como “cauda GC”) de cerca de 40 pares de base é incorporada num dos *primers* de cada amplificação e é consequentemente incluída no amplificação em questão. Tal permite que não haja uma desnaturação completa do fragmento, provocando a paragem na migração no gel. Todo o fragmento desnatura, à exceção da cauda GC.

O gel desnaturante induz o *melting* do ADN presente nas amostras carregadas em toda a corrida. Resultante deste facto, o ADN migra e apresenta um padrão de distribuição no gel distinto para cada tipo de fragmento. O padrão de cada amostra poderá ser analisado comparando-o com o de outras amostras para o mesmo produto de amplificação, permitindo assim inferir se estamos na presença de uma amostra com ou sem alterações de sequência.

Para o uso desta técnica foi necessário “carregar” no gel desnaturante pequenas amostras das *pools*.

Os géis de DGGE foram preparados a partir de uma solução de 80% Ureia/Formamida e 9% PAA e polimerizados com recurso a 5 μ l de TEMED e 50 μ l de APS a 20%.

Seguidamente os géis foram submersos num tanque com *buffer* TBE 0,5X e carregados com as *pools* previamente criadas para o efeito. A ordem de carregamento consistiu em carregar a pool A de todos os casos em poços consecutivos, seguidamente a pool B e assim sucessivamente, até à última pool. Após a última pool estar carregada, carregam-se as pools com as misturas de

polimorfismos da mesma forma. Assim, no final, foi possível analisar o padrão eletroforético de cada fragmento, comparando diretamente o mesmo fragmento em diferentes casos.

A eletroforese realizou-se de acordo com a Temperatura, Voltagem e Tempo de Corrida definidos na tabela 5 para cada gel de DGGE.

Tabela 5 - Condições de corrida para os géis de DGGE

| Gel/Gene | Gradiente de Ureia/Formamida | Buffer | Temperatura do Buffer | Voltagem | Tempo de corrida |
|---------------------|------------------------------|--------|-----------------------|-----------|------------------|
| BRCA1 | 20% | TAE | 59.5°C | 120 Volts | 18 Horas |
| | 68% | 0,5X | | | |
| BRCA2 | 30% | TAE | 55.0°C | 120 Volts | 18 Horas |
| | 65% | 0,5X | | | |
| BRCA1/2-Ex11 | 15% | TAE | 59.0°C | 120 Volts | 18 Horas |
| | 55% | 0,5X | | | |

4.8. Visualização dos géis de DGGE

Após a corrida, os géis foram submersos numa tina que continha 2 L de H₂O bi-destilada e bi-desionizada com 40 µl de Brometo de Etídio durante 20 minutos.

Seguidamente, os géis foram colocados no transiluminador Molecular Imager® Gel Doc™ XR System e fotografados sob luz UV.

Tal como referido anteriormente, a visualização de um padrão de desnaturação suspeito de mutação, levou à análise do fragmento em causa por sequenciação, de acordo com o protocolo que se segue.

4.9. Sequenciação de produtos de PCR

4.9.1. Purificação de produtos de PCR

Após amplificação dos produtos, com os mesmos *primers* utilizados para a amplificação para DGGE, estes foram então purificados, com o intuito de remover o excesso de *primers*, dNTP's e Taq DNA Polymerase não utilizados, através de um processo de ultrafiltração por coluna. O *kit* utilizado para a purificação dos produtos foi o GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden; ref 27-9602-01), seguindo as instruções do fabricante.

4.9.2. PCR de Sequenciação (PCR Assimétrico)

O passo seguinte consistiu em preparar duas reações de sequenciação para cada amostra previamente amplificada e purificada. Uma reação foi preparada com o *primer forward* para amplificar a cadeia no sentido *anti-sense* (3'-5') e a outra foi preparada com o *primer reverse* para amplificar a cadeia no sentido *sense* (5'-3').

Para cada reação de sequenciação foi utilizado o respectivo *primer* (*Forward* ou *Reverse*), a uma concentração de 1,6 pmol/μl, utilizando o kit “ABIPrism BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing” (*Applied Biosystems*, cat no. 4337450) segundo as condições abaixo referidas.

PCR assimétrico:

| | |
|---------|-------------------------------------|
| 1µl | ADN (30-60ng) |
| 1,0µl | Terminator Ready Reaction Mix (Kit) |
| 1,9µl | Buffer |
| 2,0µl | Primer (F ou R) |
| + 4,1µl | H ₂ O |
| 10µl | |

Programa utilizado:

| | | | |
|--------|------|---|-----|
| 1 min. | 94°C | → | 1X |
| 10seg. | 96°C | } | 24X |
| 5seg. | 50°C | | |
| 4min | 60°C | | |
| --- | 4°C | | |

4.9.3. Purificação de produtos de Reação de Sequenciação

Após a reação de sequenciação procedeu-se à purificação dos produtos amplificados. Esta purificação tem como objetivo remover os didesoxinucleótidos não incorporados, dNTP's, *primers* e enzima não utilizados, que podem interferir no sinal da leitura do laser do sequenciador automático. Os produtos de sequenciação obtidos foram purificados em colunas com resina Sephadex® a 7% (GE Healthcare). Inicialmente efetuou-se uma centrifugação a 3500G durante 4 minutos para retirar o excesso de água da resina e de seguida adicionou-se a amostra à coluna após ter sido colocada num novo tubo de 1,5 ml. Após nova centrifugação a 3500g durante 4 minutos, a amostra purificada foi transferida para um tubo de sequenciador, onde foi adicionado 12µl de formamida (Hi-Di® Formamide, Applied Biosystems), para desnaturação do produto purificado.

4.9.4. Eletroforese capilar

A eletroforese capilar efetuou-se em capilar de 36cm com Polímero POP-6 com temperatura definida para 50°C, num sequenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyser® (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)

4.9.5. Análise de sequenciações

As sequenciações obtidas foram analisadas no software Sequencing Analysis 5.2® (Applied Biosystems), e comparadas com uma sequência de

referência para o gene correspondente. (GenBank: NM_007294.2 para o gene BRCA1 e GenBank: NM_000059.3 para o gene BRCA2).

Nos casos em que não foram encontradas quaisquer mutações comprovadamente patogénicas pelas técnicas referidas anteriormente, procedeu-se ao respetivo rastreio por *Multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) de grandes deleções e grandes duplicações.

4.10. Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA)

As reações de MLPA para ambos os genes elaboraram-se de acordo com as recomendações dos *kits* comerciais da MRC-Holland (MRC-Holland).

Os controlos normais utilizados neste trabalho são amostras de sangue de pessoas sem qualquer indicação clínica ou historial familiar relacionado com cancro da mama o que reduz a praticamente a zero a probabilidade de serem portadoras de uma grande deleção/duplicação nos genes BRCA1/BRCA2. Além dos controlos normais utilizados, cada *kit* contém controlos internos (sondas que hibridizam em regiões cromossómicas fora das regiões de interesse) e controlos de quantidade e desnaturação do ADN: *Q-fragments* e *D-fragments*, respetivamente.

Para o BRCA1, os kits utilizados foram:

- SALSA MLPA kit P002B1
- SALSA MLPA kit P002C1 (versão atualizada do kit P002B1)
- SALSA MLPA kit P087 (utilizado somente se existir suspeita de alteração com o kit P002B, para confirmar o resultado)

Para o BRCA2, os kits utilizados foram:

- SALSA MLPA kit P090A2
- SALSA MLPA kit P077 (utilizado somente se existir suspeita de alteração com o kit P090, para confirmar o resultado)

As informações detalhadas acerca das sondas de cada kit estão descritas no anexo 3.

Os primers utilizados para a reação de MLPA foram:

Tabela 6 - Sequência dos primers para a reação de MLPA

| | |
|--|-------------------------------|
| Salsa PCR <i>forward primer</i> (marcado com FAM) | 5'-GGGTTCCCTAAGGGTTGGA-3' |
| Salsa PCR <i>reverse primer</i> (não marcado) | 5'-GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA-3' |

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização de mutações na amostra previamente selecionada

A amplificação de todas as zonas relevantes dos genes BRCA1 e BRCA2 das 121 amostras utilizadas resultaram em produtos do tamanho esperado (Exemplo- Anexo 4). Todos os géis de DGGE (Exemplo - Anexo 5) foram analisados segundo as recomendações de Van der Hout (Van der Hout *et al.*, 2006) e todos os géis de agarose (relativos ao rastreio da mutação fundadora portuguesa), foram analisados de acordo com as recomendações de Peixoto e colaboradores (Peixoto, *et al.*, 2008) (Exemplo – Anexo 7).

Dos 121 casos amplificados (484 alelos estudados), correspondendo aos casos novos de cancro da mama com suspeita de HBOC estudados no GDPN em 2009, que cumpriam os requisitos da NCCN, foram detetados 42 casos (34,7%) que apresentavam alguma alteração num dos BRCA's.

Nestes 42 casos, foram detetadas 45 alterações, 26 das quais (57,7%) mutações missense, 1 (2,2%) mutação nonsense, 1 (2,2%) mutação silenciosa, 8 (17,7%) mutações intrónicas, 4 (8,8%) inserções levando a splicing alternativo, 3 (6,6%) mutações *frameshift*, 1 (2,2%) *deleção in-frame* e 1 (2,2) grande deleção.

A tabela 7 resume as alterações encontradas nos 42 casos atrás referidos, sem mencionar polimorfismos. Todas as alterações encontradas apresentavam-se em heterozigotia, correspondendo assim a 42-45 alelos mutados (dependendo da sua posição em cis ou trans), 8 para o gene BRCA1 e 34-37 para o gene BRCA2.

Nos restantes 79 casos, não foram detetadas mutações patogénicas ou de significado desconhecido, embora tenham sido detetados nalguns casos polimorfismos conhecidos destes genes sem significado clínico (dados não apresentados).

Tabela 7 - Casos com alterações num dos genes BRCA e classificação das alterações encontradas

| Nº do caso | Idade no diagnóstico | Gene afetado | Exão afetado | Posição no cADN* | Posição na proteína* | Tipo de mutação | Classificação da mutação | Classificação Polyphen-2 | Classificação Splice-Site |
|------------|----------------------|--------------|-------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| N3 | 43 | BRCA2 | Exão 25 | c.9382C>T | p.Arg3128Ter | Nonsense | Patogénica | - | - |
| N35 | 68 | BRCA2 | Exão 11 | c.3680_3681delTG | p.Leu1227fs | Frameshift | Patogénica | - | - |
| N38 | 51 | BRCA2 | Exão 14 | c.7258delG | p.Glu2420fs | Frameshift | Patogénica | - | - |
| N43 | 56 | BRCA1 | Exão 11 | c.(2016+?)-(4097-?)del | - | Grande deleção | Patogénica | - | - |
| N66 | 39 | BRCA2 | Exão 3 | c.156_157insAlu | - | Inserção ALU | Patogénica | - | - |
| N72 | 42 | BRCA2 | Exão 3 | c.156_157insAlu | - | Inserção ALU | Patogénica | - | - |
| N83 | 46 | BRCA2 | Exão 3 | c.156_157insAlu | - | Inserção ALU | Patogénica | - | - |
| N85 | 36 | BRCA2 | Intrão 9 | c.793+1G>A | - | Splicing alternativo | Patogénica | - | - |
| N88 | 50 | BRCA1 | Exão 11 | c.3331_3334delCAAG | p.Gln1111fs | Frameshift | Patogénica | - | - |
| N112 | 72 | BRCA2 | Exão 3 | c.156_157insAlu | - | Inserção ALU | Patogénica | - | - |
| N8 | 43 | BRCA2 | Exão 10 | c.1123C>T | p.Pro375Ser | Missense | Ñ desc./ñ class. | Prov. Deletéria | - |
| N47 | 24 | BRCA2 | Exão 10 | c.1385A>G | p.Glu462Gly | Missense | Ñ desc./ñ class. | Prov. Deletéria | - |
| N68 | 34 | BRCA2 | Exão 11 | c.3032C>G | p.Thr1011Arg | Missense | Ñ desc./ñ class. | Prov. Deletéria | - |
| N111 | 43 | BRCA2 | Exão 3 | c.125A>G | p.Tyr42Cys | Missense | Ñ desc./ñ class. | Prov. Deletéria | - |
| N54 | 38 | BRCA2 | Exão 11 e Exão 21 | c.5744C>T e c.8668C>A | p.Thr1915Met e p.Leu2890Ile | Missense e Missense | Ñ desc./ñ class. | Poss. Deletéria e Prov. Deletéria | - |
| N7 | 53 | BRCA1 | Exão 23 | c.5425G>T | p.Val1809Phe | Missense | Ñ desc./ñ class. | Poss. Deletéria | - |
| N11 | 53 | BRCA1 | Exão 8 | c.488G>C | p.Arg163Thr | Missense | Ñ desc./ñ class. | Poss. Deletéria | - |
| N29 | 57 | BRCA2 | Exão 11 | c.3073A>G | p.Lys1025Glu | Missense | Ñ desc./ñ class. | Poss. Deletéria | - |
| N107 | 27 | BRCA2 | Exão 11 | c.5744C>T | p.Thr1915Met | Missense | Ñ desc./ñ class. | Poss. Deletéria | - |
| N120 | 51 | BRCA2 | Exão 11 | c.5744C>T | p.Thr1915Met | Missense | Ñ desc./ñ class. | Poss. Deletéria | - |
| N104 | 31 | BRCA2 | Exão 11 e Exão 22 | c.6100C>T e c.8850G>T | p.Arg2034Cys e p.Lys2950Asn | Missense e Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna e Poss. Deletéria | - |

| | | | | | | | | | |
|-------------|----|-------|-------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|------------------|-------------|------------|
| N1 | 55 | BRCA1 | Exão 16 | c.4956G>A | p.Met1652Ile | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N9 | 34 | BRCA2 | Exão 10 | c.1714G>A | p.Val572Ile | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N16 | 33 | BRCA2 | Exão 11 | c.6100C>T | p.Arg2034Cys | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N23 | 48 | BRCA2 | Exão 11 | c.4915G>A | p.Val1639Ile | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N28 | 49 | BRCA2 | Exão 11 | c.6323G>A | p.Arg2108His | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N36 | 52 | BRCA2 | Exão 11 | c.5634C>G | p.Asn1878Lys | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N55 | 41 | BRCA2 | Exão 11 | c.6100C>T | p.Arg2034Cys | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N75 | 51 | BRCA1 | Exão 15 | c.4636G>A | p.Asp1546Asn | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N92 | 40 | BRCA2 | Exão 27 | c.10234A>G | p.Ile3412Val | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N93 | 37 | BRCA2 | Exão 11 | c.6100C>T | p.Arg2034Cys | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N100 | 40 | BRCA2 | Exão 11 | c.6100C>T | p.Arg2034Cys | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N118 | 33 | BRCA2 | Exão 25 | c.9292T>C | p.Tyr3098His | Missense | Ñ desc./ñ class. | Benigna | - |
| N116 | 34 | BRCA2 | Exão 11 e Exão 14 | c.6513C>G e c.7397C>T | p.(=) E p.Ala2466Val | Silenciosa e Missense | Ñ desc./ñ class. | - e Benigna | - |
| N78 | 36 | BRCA2 | Exão 14 | c.7426_7428delGAA | p.Glu2476del | Deleção in-frame | Ñ desc./ñ class. | - | - |
| N18 | 37 | BRCA2 | Intrão 25 | c.9501+4A>G | - | Intrónica | Ñ desc./ñ class. | - | Não altera |
| N21 | 34 | BRCA2 | Intrão 24 | c.9257-16T>C | - | Intrónica | Ñ desc./ñ class. | - | Não altera |
| N48 | 60 | BRCA1 | Intrão 2 | c.81-14C>T | - | Intrónica | Ñ desc./ñ class. | - | Não altera |
| N63 | 46 | BRCA1 | Intrão 18 | c.5152+9A>T | - | Intrónica | Ñ desc./ñ class. | - | Não altera |
| N94 | 30 | BRCA1 | Intrão 15 | c.4676-44A>C | - | Intrónica | Ñ desc./ñ class. | - | Não altera |
| N108 | 58 | BRCA2 | Intrão 24 | c.9257-16T>C | - | Intrónica | Ñ desc./ñ class. | - | Não altera |
| N109 | 61 | BRCA2 | Intrão 7 | c.632-22C>T | - | Intrónica | Ñ desc./ñ class. | - | Não altera |

* Classificação com base na sequência de referência do GenBank: NM_007294.2 para o gene BRCA1 e a sequência de referência do GenBank: NM_000059.3 para o gene BRCA2, de acordo com a nomenclatura HGVS®.

A análise e classificação destas mutações baseou-se em pesquisas bibliográficas e na consulta de bases de dados de mutações para os genes BRCA1 e BRCA2 (BIC Database® e HGMD Professional ®). As alterações encontradas foram subdivididas em 3 classes diferentes;

- Mutações Patogénicas – Mutações descritas na literatura e nas bases de dados como comprovadamente patogénicas.
- Mutações não descritas/não classificadas – Mutações que nunca foram descritas na literatura nem em bases de dados, ou que, embora previamente descritas, são de patogenicidade desconhecida.

De acordo com a análise atrás referida, verificou-se que, dos 42 casos com alterações, apenas 10 casos (23,8%) apresentavam mutações comprovadamente patogénicas.

Assim, no total dos casos estudados, em apenas 8,3% (10/121) foi detetada uma mutação comprovadamente patogénica.

A frequência alélica das mutações patogénicas para o gene BRCA1 relativamente a todos os alelos mutados encontrados foi de 25% (2/8) e para o gene BRCA2 de 21,6% a 23,5% (8/34-37). No total as mutações patogénicas de ambos os genes representam entre 22,2% e 23,8% (10/42-45) de todos os alelos mutados encontrados.

Analisando as mutações patogénicas, as mutações causadoras de splicing alternativo representam 50% do total.

A mutação c.156_157ins_Alu, localizada no exão 3 do gene BRCA2, a mutação fundadora portuguesa, representa 40% de todas as mutações patogénicas encontradas.

Nos restantes 32 casos (76,2%), as mutações encontradas foram classificadas como não descritas/não classificadas.

Através de algoritmos de cálculo bioinformáticos, obteve-se uma previsão do significado clínico destas mutações. Para tal, cada mutação *missense* encontrada com patogenicidade desconhecida foi analisada pelo algoritmo Polyphen-2®. Este algoritmo, que tem em conta a conformação da proteína originada pelo gene correspondente, os seus locais conservados e de interação

com outras proteínas, permite inferir se a mutação poderá afetar o correto funcionamento da mesma.

Às mutações estudadas, o *software* pode atribuir uma de três classificações:

- Benigna – Classificação de baixo risco, com baixa probabilidade de afetar o correto funcionamento da proteína.
- Possivelmente Deletéria – Classificação de risco intermédio, sendo de ponderar a possibilidade de afetar o funcionamento da proteína.
- Provavelmente Deletéria – Classificação de risco elevado, geralmente associada a alterações em zonas críticas, como por exemplo zona com sequências altamente conservadas do gene e/ou zonas de ligação a fatores de transcrição.

Para a classificação das mutações intrónicas localizadas perto da extremidade 5' ou 3' de algum exão, foi usado o algoritmo de cálculo Splice-Site Prediction Test®.

Algumas destas alterações foram encontradas em mais do que um paciente. Com efeito, a mutação c.6100C>T (p.Arg2034Cys), presente no exão 11 do gene BRCA2, foi detetada em 5 dos 32 casos com mutações com patogenicidade desconhecida, o que representa uma frequência alélica entre 14,3% e 15,6% (5/32-35) relativamente a casos com mutações de patogenicidade desconhecida.

5.1.1. Estudo do algoritmo BRCAPro®

Para a segunda parte deste estudo, foram selecionados 15 casos em que se obteve a informação pormenorizada da história familiar (incluindo as árvores genealógicas elaboradas por um geneticista) e que apresentavam mutação patogénica num dos genes BRCA.

De seguida, calculou-se o valor da probabilidade de cada caso index ter uma mutação do gene BRCA1 ou BRCA2, com recurso à informação das árvores genealógicas, história familiar e características dos tumores, no programa BRCAPro®.

Na seguinte tabela (Tabela 8) e gráfico (Gráfico 1) encontram-se em detalhe os resultados do cálculo para esta amostra.

Tabela 8 - Classificação de probabilidades do BRCAPro® nos casos selecionados

| Nº do caso | Gene afetado | Idade no diagnóstico | Probabilidade de mutação no gene BRCA1 | Probabilidade de mutação no gene BRCA2 | Probabilidade conjunta de mutação num dos genes |
|------------|--------------|----------------------|--|--|---|
| P1 | BRCA2 | 63 | 0,027 | 0,163 | 0,190 |
| P2 | BRCA2 | 51 | 0,037 | 0,235 | 0,272 |
| P3 | BRCA2 | 45 | 0,036 | 0,032 | 0,068 |
| P4 | BRCA2 | 42 | 0,549 | 0,229 | 0,779 |
| P5 | BRCA1 | 55 | 0,165 | 0,477 | 0,643 |
| P6 | BRCA2 | 38 | 0,146 | 0,12 | 0,266 |
| P7 | BRCA1 | 50 | 0,501 | 0,233 | 0,734 |
| P8 | BRCA2 | 40 | 0,056 | 0,249 | 0,306 |
| P9 | BRCA2 | 70 | 0,033 | 0,347 | 0,380 |
| P10 | BRCA2 | 26 | 0,002 | 0,008 | 0,011 |
| P11 | BRCA2 | 40 | 0,013 | 0,01 | 0,022 |
| P12 | BRCA1 | 32 | 0,027 | 0,019 | 0,046 |
| P13 | BRCA2 | 51 | 0,634 | 0,213 | 0,847 |
| P14 | BRCA2 | 35 | 0,219 | 0,14 | 0,359 |
| P15 | BRCA2 | 46 | 0,045 | 0,049 | 0,094 |

Nos casos selecionados, as probabilidades conjuntas de mutação num dos genes BRCA, calculadas pelo programa referido, variaram entre 1,1% e 84,7% (média: 33,4%; mediana: 27,2%). A média de idades destes 15 pacientes era de 45,6 anos (mediana: 45 anos).

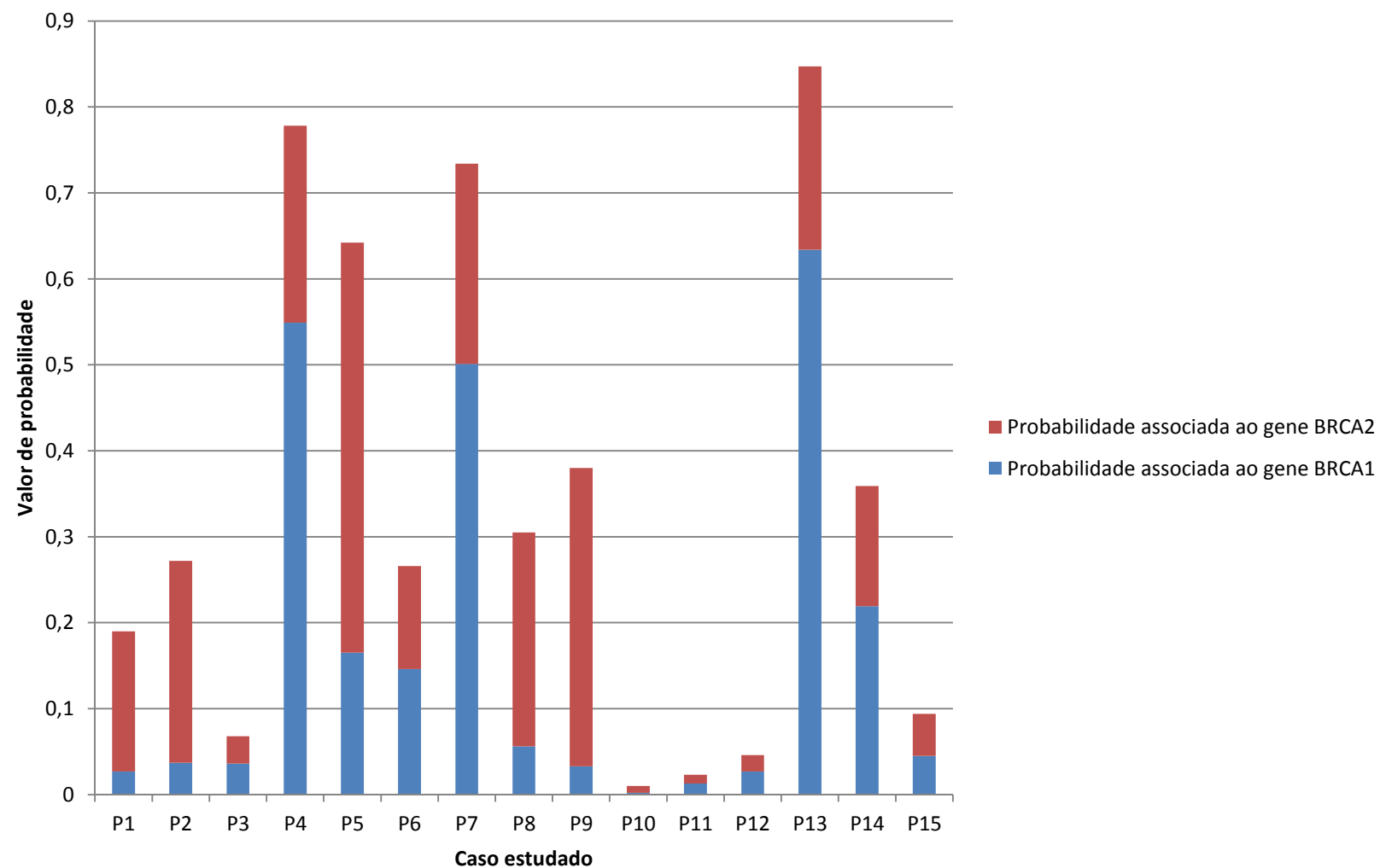


Gráfico 1- Distribuição das probabilidades calculadas pelo algoritmo BRCAPro®

DISCUSSÃO DE RESULTADOS

6. Discussão de resultados

6.1. Análise mutacional dos genes BRCA1 e BRCA2

A caracterização do perfil de mutações patogénicas dos genes BRCA1 e BRCA2 numa amostragem previamente selecionada e a análise comparativa das mutações encontradas com as de outras amostragens em diferentes estudos, constituem dois dos objetivos deste trabalho.

Nesta parte do estudo, todos os 121 casos índice selecionados, correspondem aos pedidos do ano de 2009 que deram entrada no GDPN para estudo dos genes BRCA1 e BRCA2 e que cumpriam os critérios NCCN para estudo destes genes. O ano selecionado foi condicionado por vários fatores, de entre os quais, ser o ano com uma maior distribuição de pedidos por todo o país e, embora tenha sido o primeiro ano de vigência dos critérios da NCCN, ser o ano com maior amostragem que respeitava estes critérios.

Foram detetadas alterações em heterozigotia ao nível de um destes dois genes em 34,7% (42/121) dos casos estudados, excluindo as variantes polimórficas. No entanto, apenas 8,3% (10/121) dos casos continham mutações comprovadamente patogénicas, sendo 1,7% (2 em 121) no gene BRCA1 e 6,6% (8/121) no gene BRCA2.

6.1.1.1. Comparação da prevalência de mutações patogénicas em diferentes estudos

A dificuldade de comparação da taxa de prevalência de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 decorre, por um lado, da grande variabilidade de resultados em estudos diferentes, incluindo os relativos a uma mesma população e, por outro lado, da inevitável diferença entre séries no que concerne a critérios de referenciação para estudo. Com efeito, e a título de exemplo, estudos realizados na população brasileira revelaram uma variação na prevalência destas mutações entre 3,4% (Esteves *et al.*, 2009) e 13% (Dufloth *et al.*, 2005).

Em Portugal, nos estudos de Soares e colaboradores em 2000 e Duarte e colaboradores em 2002 (Soares *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2002), a prevalência média de mutações patogénicas foi de 6,5%, enquanto Peixoto e colaboradores, em estudo mais recente, identificaram 30 pacientes com mutações patogénicas numa coorte de 100 pacientes índice, o que corresponde a uma prevalência de 30% (Peixoto *et al.*, 2006; Peixoto *et al.*, 2008).

No estudo conducente a esta dissertação, a taxa de prevalência de mutações patogénicas dos genes BRCA1 ou BRCA2 cifrou-se nos 8,3%, situando-se, portanto, entre os 6,5% e os 30% dos estudos anteriores na população portuguesa.

Já no estudo inicial de Peixoto e colaboradores a taxa de mutações patogénicas encontrada era bastante superior aos 8,3% do presente estudo (Peixoto *et al.*, 2006). Em 2008, Peixoto e colaboradores realizaram um novo estudo que colmatou uma importante falha do primeiro estudo por eles realizado, procurando especificamente a mutação fundadora portuguesa c.156_157insAlu na amostragem do estudo anterior nos doentes em que não tinha sido encontrada mutação comprovadamente patogénica (Peixoto *et al.*, 2008). Tal estudo permitiu detetar a mutação referida em 8 casos o que aumentou a prevalência de mutações patogénicas relativamente ao estudo anterior, de 22% (22/100) para 30% (30/100) (Peixoto, *et al.*, 2008).

A discrepância na prevalência obtida entre o estudo mais recente de Peixoto e colaboradores e o presente estudo poder-se-ia dever teoricamente a qualquer uma das seguintes razões,

- Menor sensibilidade das técnicas de estudo utilizadas no GDPN e/ou erro na análise dos resultados obtidos das mesmas
- Diferenças entre as populações estudadas no IPO e no GDPN

Relativamente à possibilidade de a menor prevalência de mutações patogénicas na nossa série traduzir uma menor sensibilidade da técnica e/ou erro na análise, seria de esperar que tais problemas afetassem da mesma forma todas as alterações encontradas e não apenas as mutações patogénicas.

Ora, a prevalência de VUS detetada na nossa série foi de 28,9% (35/121), enquanto no estudo de Peixoto e colaboradores, a prevalência observada de VUS foi de 20%. Por outro lado, é de referir que as técnicas utilizadas no estudo conduzido por Peixoto e colaboradores e por nós foram as mesmas, o que depõe contra a existência de as discrepâncias notadas terem origem nos métodos usados.

Assim, parece mais plausível que as diferenças observadas entre os dois estudos traduzam a existência de critérios de referenciação diferentes entre as duas séries estudadas. De fato, a análise cuidada da caracterização clínica das duas amostras estudadas revela diferenças importantes.

Enquanto no estudo de Peixoto, 30% (30/100) dos indivíduos estudados tinham história pessoal ou familiar de cancro da mama e ovário, no presente estudo apenas 9,1% (11/121) das famílias apresentavam história pessoal ou familiar de cancro da mama e ovário. Tendo em conta que, no contexto do cancro hereditário da mama/ovário, nas famílias em que há história de cancro do ovário se verifica uma maior prevalência de mutações patogénicas dos genes BRCA1 e BRCA2 (sobretudo do primeiro) do que em famílias apenas com cancro da mama (Chen *et al.*, 2007), a inclusão de maior número de casos com cancro do ovário poderá ter contribuído para uma maior prevalência de mutações patogénicas observada na amostra de Peixoto e colaboradores.

Por outro lado, enquanto na nossa série foram estudados 53 doentes (43,8% do total) com cancro da mama antes dos 45 anos, sem história familiar de cancro da mama/ovário, este grupo representa apenas 5% da amostra de Peixoto e colaboradores (Peixoto *et al.*, 2006).

Dado que este critério de referenciação (cancro da mama em idade jovem) é, na ausência de história familiar de cancro da mama/ovário, um preditor pouco sensível da presença de mutações patogénicas dos genes BRCA1 ou BRCA2, seria de esperar uma menor prevalência de mutações patogénicas na nossa amostra, apenas com base nas diferenças observadas quanto a este aspeto.

As mesmas razões que explicam as diferentes prevalências de mutações patogénicas observadas no presente trabalho e no estudo de Peixoto e colaboradores poderão justificar as discrepâncias verificadas entre estudos

realizados em diferentes países, embora não seja possível excluir uma prevalência genuinamente diferente entre populações distintas.

Assim, e a título de exemplo, no principal estudo acerca da prevalência e tipo de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 para a população espanhola, o resultado obtido numa série de 624 indivíduos com suspeita de HBOC foi de 18,1% (113/624), no que respeita a mutações patogénicas (Díez *et al.*, 2003). A amostragem foi selecionada por critérios de referenciação similares aos do estudo aqui apresentado, embora com distribuições diferentes dos doentes segundo diversos critérios para estudo.

6.1.1.2. Comparação do perfil de mutações patogénicas em diferentes estudos

Muito embora a prevalência de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 seja similar em diferentes etnias/raças (Hall *et al.*, 2009), há diferenças significativas entre populações/países particularmente quanto a determinadas mutações específicas.

Relativamente à população portuguesa, é de sublinhar a mutação fundadora portuguesa c.156_157insAlu, localizada no gene BRCA2, que representou 40% (4/10) das mutações patogénicas e 8,8% (4/45) de todas as mutações encontradas neste estudo. Estas frequências estão de acordo com o que foi inicialmente descrito no estudo de Machado e colaboradores (Machado *et al.*, 2007), no qual esta mutação representava 8% de todas as mutações encontradas. No estudo de Peixoto e colaboradores em 2008 foi descrita uma prevalência de 27% (8/30) desta mutação relativamente a todas as mutações patogénicas encontradas (Peixoto *et al.*, 2008) o que situa um pouco abaixo dos 40% do presente estudo. A elevada prevalência desta mutação na população portuguesa revela a importância de a mesma ser pesquisada especificamente, tendo em conta que esta mutação não é detetável por DGGE ou MLPA.

Ainda relativamente à população portuguesa, o perfil de mutações patogénicas relatado no estudo de Peixoto e colaboradores (Peixoto *et al.*, 2006), e o observado na nossa amostra revelou diferenças. Com efeito, a única mutação

patogénica recorrente observada no nosso estudo foi a mutação fundadora atrás referida (c.156_157insAlu), enquanto no estudo de Peixoto e colaboradores as mutações 2156delinsCC e 3450_3453del4, ambas no BRCA1, foram observadas cada uma delas, em 3 famílias diferentes.

Estes estudos poderão indicar a existência de mais duas mutações fundadoras em Portugal, menos frequentes do que a c.156_157insAlu.

Curiosamente, uma dessas mutações (c.3450_3453del4 no BRCA1) foi encontrada numa paciente na nossa amostra, descrita como c.3331_3334delCAAG (de acordo com as mais recentes alterações à nomenclatura destes dois genes).

Foram também identificadas mutações patogénicas recorrentes (prevalência > 2%) em todos os demais grupos populacionais (Ferla *et al.*, 2007). Por exemplo, na população brasileira, as mutações com maior prevalência 5382insC e ins6kb, localizadas no exão 13 do BRCA1, representam entre 56% e 61,9% das mutações patogénicas encontradas naquela população e são consideradas mutações fundadoras da população brasileira (Esteves *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2007), enquanto em Portugal são pouco frequentes (5382insC) ou ainda não observadas (ins6KB).

No estudo de Díez e colaboradores, das mutações patogénicas identificadas na população estudada com casos provenientes da população espanhola, observaram-se cinco particularmente prevalentes no BRCA1 e quatro no BRCA2, a saber: no BRCA1, as mutações 187_188delAG, 330A>G, 5236G>A, 5242C>A, e 589_590del e, no BRCA2, as mutações 3036_3039del, 6857_6858del, 9254_9258del e 9538_9539del (Diez *et al.*, 2003).

De fato, no estudo de Díez e colaboradores, as cinco mutações referidas no BRCA1 e as quatro no BRCA2 representavam 46,6% e 56,6% das mutações patogénicas encontradas nesses genes, respetivamente (Díez *et al.*, 2003).

É de referir que três destas mutações mais prevalentes (330A>G, 589_590del no gene BRCA1 e 3036_3039del no gene BRCA2) foram detetadas na amostra estudada por Peixoto e colaboradores ainda que apareçam em apenas 1 doente, cada uma (Peixoto *et al.*, 2006). No entanto, nenhuma das citadas mutações foi detetada na nossa amostragem. Por outro lado, nenhuma

das mutações prevalentes identificadas no estudo de Peixoto e colaboradores foi detetada no estudo de Díez e colaboradores (Díez *et al.*, 2003). Parece lícito concluir, portanto, que, a despeito da proximidade geográfica, a população espanhola tem um perfil e prevalência de mutações patogénicas recorrentes bastante distintos da verificada na amostragem por nós estudada.

Foram também identificadas mutações fundadoras em diversos países europeus, representando, a título de exemplo, em Itália, 27% de todas as mutações patogénicas encontradas e em França uma média de 52% (Janavicus, 2010).

Importa então referir que, à exceção da mutação fundadora portuguesa c.156_157insALU do gene BRCA2, e porventura das outras duas mutações descritas por Peixoto como especialmente prevalentes localizadas no gene BRCA1 (2156delinsCC e 3450_3453del4), não foram encontrados *hotspots* de mutações nestes dois genes que permitam iniciar o rastreio por essas zonas.

Como visto neste estudo, as mutações pontuais (incluindo missense, nonsense, frameshift, e mutações splice-site) foram responsáveis por 50% (5/10) das mutações patogénicas encontradas nas famílias com HBOC estudadas, enquanto a inserção Alu representa 40% (4/10), tendo sido ainda descrita uma grande deleção (1/10).

Nalgumas populações, estes grandes rearranjos podem ser responsáveis por até 1/3 de todas as mutações patogénicas encontradas (Hogervorst *et al.*, 2003; Montagna *et al.*, 2003; Casilli *et al.*, 2006). Embora esta proporção tão elevada não se verifique na amostragem aqui estudada, torna-se importante referir que a técnica de MLPA aumentou a nossa taxa de deteção de mutações patogénicas. Dada a grande variabilidade na prevalência deste tipo de mutações de população para população, o recomendável seria inicialmente determinar a prevalência destas na população que irá ser estudada, antes de fazer quaisquer recomendações definitivas acerca do protocolo de rastreio a adotar para o tipo de população em estudo. Em populações com alta incidência deste tipo de mutações, o rastreio inicial por MLPA (ou técnica equivalente) poderá ser uma

estratégia com uma excelente relação custo/benefício, mas tal não se aplica em populações onde a incidência é baixa.

No presente estudo, bem como nos demais realizados em doentes portugueses (Peixoto *et al.*, 2006), a percentagem de casos com grandes deleções foi consistentemente baixa (2 casos em 221 estudados), pelo que a melhor estratégia passará provavelmente por se fazer o rastreio de grandes rearranjos após o rastreio completo dos genes se ter revelado negativo para outro tipo de mutações patogénicas.

6.1.1.3. Caracterização das VUS

A elevada prevalência de VUS na nossa amostra (35/121) justifica a necessidade de tentar esclarecer o seu eventual significado clínico.

Embora não seja possível estimar a patogenicidade de determinadas mutações sem complexos estudos funcionais, estão disponíveis ferramentas bioinformáticas que podem ajudar a perceber qual o seu efeito funcional.

Tendo em conta que a percentagem de mutações missense entre as mutações de patogenicidade desconhecida foi alta [74,3% (26/35)], o algoritmo de cálculo Polyphen-2®, que estima a patogenicidade das mesmas, foi de elevado interesse para este estudo.

Das 26 mutações missense encontradas, 14 foram consideradas pelo Polyphen-2® como “Benignas”, pelo que é de presumir que não alterem a função da proteína. O fato de uma das alterações detetadas consideradas “Benignas” (p.Arg2034Cys), ter sido observada em 4 casos e de ter sido já descrita a sua segregação em conjunto com uma mutação patogénica (Deffenbaugh *et al.*, 2002) corrobora a classificação feita pelo programa usado.

Neste estudo 20% (7/35) das VUS detetadas foram consideradas “Possivelmente Deletérias”. Esta categoria traduz um risco moderado de as mesmas terem impacto funcional na proteína.

Destas 26 mutações missense, 5 foram consideradas como “Provavelmente Deletérias”. Tal significa que estão localizadas em zonas críticas do gene e que, após a tradução, poderão alterar a conformação ou comportamento da proteína correspondente.

A elevada frequência de VUS dos genes BRCA1 e BRCA2 na generalidade dos estudos coloca obviamente dificuldades no seguimento clínico e aconselhamento genético destes doentes, quando não é detetada uma mutação comprovadamente patogénica.

Nas VUS classificadas como possível ou provavelmente patogénicas poderá ser considerada a pesquisa das mesmas nos demais familiares com cancro da mama e/ou ovário, no sentido de avaliar se as mesmas co-segregam com a doença. Se tal se verificar, será um dado adicional a ter em conta na presunção (mas nunca certeza) da sua patogenicidade.

No entanto, mesmo os estudos de segregação das VUS em familiares com cancro, não alteram habitualmente a recomendação de uma vigilância clínica/imagiológica reforçada em todos os familiares em 1º grau de doentes pertencentes a famílias suspeitas de HBOC.

Os dilemas atrás referidos explicam o interesse crescente no desenvolvimento de ferramentas multidisciplinares (estudos epidemiológicos, in-vitro e in-silico) para a avaliação do significado e impacto destas variantes, o que permite uma justificada esperança de que venha a haver progressos significativos nesta área (Houdayer *et al.*, 2012).

6.2. Estudo do algoritmo de cálculo BRCAPro®

Como se depreende da grande discrepância entre estudos, no que refere à prevalência de mutações patogénicas dos genes BRCA1/BRCA2 em doentes/famílias com suspeita de HBOC, os critérios para referenciação de doentes para estudo genético podem variar consideravelmente.

De fato, para além da análise das famílias segundo o critério do médico, existem ferramentas informáticas que tentam prever, com base na história pessoal e familiar, a probabilidade de um determinado doente (ou familiar) ser portador de uma mutação patogénica.

Dos programas mais comumente usados em consultas de Oncogenética da Mama, são de referir o BRCAPro®, o programa Myriad® e o Boadicea®, todos

com os seus pontos-fortes e desvantagens, quer na eficácia de análise, quer na facilidade de utilização.

Seja qual for o programa usado para decidir sobre a existência, ou não, de critérios, para estudo genético, não existe unanimidade quanto ao limiar de probabilidade de mutação a partir do qual se recomenda o estudo.

Com efeito, se na VI Reunião de Consenso Nacional do Cancro da Mama, que decorreu no Luso em 2008, bem como nas recomendações da maioria dos países europeus, se recomenda a adoção de um *cut-off* de 10% de probabilidade de mutação nos genes BRCA1/2 para estudo genético, no Reino Unido é adotado um critério mais restritivo (20%) (Antoniou *et al*, 2008; Parmigiani, 1198; Berry, 2002; NICE, 2006).

Em Portugal, o programa BRCAPro® é provavelmente o mais utilizado na avaliação de famílias com cancro da mama.

Um dos objetivos do presente estudo consistia na avaliação retrospectiva do desempenho deste programam em doentes/famílias estudados no GDPN, nos quais foi detetado mutação patogénica.

Infelizmente, dada a multiplicidade de centros requisitantes, foi complicado reunir a informação completa sobre famílias estudadas. Ainda assim, foram selecionados 15 doentes com mutação patogénica que não fazem parte da série estudada na secção anterior, dos quais conseguimos obter as árvores genealógicas elaboradas por geneticistas.

Relativamente ao estudo desses 15 pacientes com o algoritmo de cálculo bioinformático BRCAPro® verificou-se que a probabilidade conjunta de mutação patogénica num dos dois genes, variou entre 1,1% e 84,7% (média de 33,4%; mediana 27,2%). Cinco dos 15 pacientes (33,3%) teriam uma probabilidade de mutação abaixo dos 10%, o que implicaria que não teriam efetuado estudo genético, caso a decisão de o realizar fosse baseada exclusivamente nesse apoio informático. Caso fosse utilizado o *cut-off* de 20%, a perda de casos positivos subiria para 40% (6/15).

Baseado nos dados expostos, conclui-se que o algoritmo de cálculo BRCAPro® não deverá ser descurado, mas também não deverá utilizado sozinho no rastreio de pacientes com suspeita de HBOC para estudo genético.

De fato, há mais critérios a ponderar na análise de uma família com cancro, para além dos considerados pelas ferramentas informáticas disponíveis, pelo que, em última instância, deverá prevalecer o critério médico, no que concerne à decisão de propor, ou não, estudo genético.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

Com este estudo concluiu-se que a prevalência de mutações patogénicas na amostragem utilizada é inferior à encontrada na literatura, comparativamente a outros estudos na população portuguesa, efetuados com técnicas de rastreio semelhantes (estudo de Peixoto e colaboradores). A discrepância observada entre estas duas séries poderá ter resultado da existência de critérios de referenciação diferentes e diferenças na composição das amostragens utilizadas (inclusão de uma maior percentagem de pacientes sem história familiar de cancro da mama/ovário, mas com cancro diagnosticado em idade inferior a 45 anos, na nossa série e a inclusão de uma maior percentagem de casos com cancro do ovário no estudo de Peixoto e colaboradores).

A prevalência da mutação fundadora portuguesa (c.156_157insAlu, localizada no gene BRCA2), está de acordo com o descrito na literatura em estudos na população portuguesa (Machado *et al.*, 2007; Peixoto *et al.*, 2008). No entanto, concluiu-se que a sua prevalência relativamente a outras mutações patogénicas está um pouco acima do que foi anteriormente descrito por Peixoto e colaboradores (Peixoto *et al.*, 2008). Assim, a elevada prevalência desta mutação na população portuguesa revela a importância de a mesma ser pesquisada especificamente quando forem utilizadas técnicas que não a detetem (como o DGGE ou MLPA).

Com efeito, atendendo às limitações da amostragem deste estudo, pode concluir-se que, à exceção da mutação fundadora portuguesa e, porventura, das outras duas mutações descritas por Peixoto como especialmente prevalentes localizadas no gene BRCA1 (2156delinsCC e 3450_3453del4), não foram encontrados *hotspots* de mutações nestes dois genes que permitam iniciar o rastreio por essas zonas.

Por outro lado, ainda que a percentagem de casos com grandes deleções neste estudo e noutros da população portuguesa tenha sido consistentemente baixa, torna-se importante referir que a técnica de MLPA aumentou a nossa taxa de deteção de mutações patogénicas. Assim, a melhor estratégia para o rastreio dos genes BRCA1 e BRCA2 na população portuguesa, passará provavelmente

por se fazer o rastreio de grandes rearranjos após o rastreio completo dos genes se ter revelado negativo para outro tipo de mutações patogénicas.

A elevada frequência de VUS no estudo conducente a esta dissertação coloca obviamente dificuldades no diagnóstico, seguimento clínico e aconselhamento genético destes doentes, quando não é detetada uma mutação comprovadamente patogénica. Destas dificuldades, decorre a necessidade da criação e desenvolvimento de ferramentas e estudos multidisciplinares (estudos epidemiológicos, *in-vitro* e *in-silico*) para a avaliação do significado clínico e impacto destas variantes.

Dos programas mais comumente usados em consultas de Oncogenética da Mama, o BRCAPro®, aqui avaliado, tem limitações importantes no que concerne à quantidade de variáveis e critérios a ponderar para o cálculo das probabilidades de mutação. Baseado nos dados expostos, concluiu-se que o algoritmo de cálculo BRCAPro® não deverá ser descurado, mas também não deverá utilizado sozinho no rastreio de pacientes com suspeita de HBOC para estudo genético.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

Antoniou, A. *et al.*, Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. *Cancer Research*, 2010;70(23):9742-9754.

Antoinou, A. *et al.*, Predicting the likelihood of carrying a BRCA2 or BRCA1 mutation: validation of BOADICEA, BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics clinics. *J.Med.Genet*, 2008;45:425-431.

Bellosillo, B.; Tusquets, I., Pitfalls and caveats in BRCA sequencing. *Ultrastructural Pathology*, 2006;30:229-235.

Berry, BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol*, 2002;20:2701–2712

Bignell, G. *et al.*, The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins Human. *Molecular Genetics*, 1997;6(1):53-58.

Blackshear, P. E. *et al.*, Brca1 and Brca2 expression patterns in mitotic and meiotic cells of mice. *Oncogene*. 1998;16:61-68.

Bochar, D. *et al.*, BRCA1 is associated with a human SWI/SNF- related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell*, 2000;102:257-265.

Bordeleau, L. *et al.*, Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;119(1):13-24.

Boulton, SJ., Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans* 2006;34:633-645

Buchholz,T.A., et al., Evidence of haplotype insufficiency in human cells containing a germline mutation in BRCA1 or BRCA2. *Int. J. Cancer*. 2002;97,557–561.

Buller, R. E. *et al.*, Association Between Nonrandom X-Chromosome Inactivation and BRCA1 Mutation in Germline DNA of Patients With Ovarian Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91:339-346.

Calle, EE., et al., Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*. 2003;348:1625-1638

Campeau, PM; *et al.*, Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet*. 2008;124:31-42

Casilli, F. *et al.*, The contribution of germline rearrangements to the spectrum of BRCA2 mutations. *Journal of Medical Genetics*. 2006;43(9):e.49.

Chen, S.; Parmigiani, G., Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(11):1329-1333.

Claus, E.B., *et al.*, The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*. 1996;77, 2318-24.

Cocco, P., On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad Saúde Pública*. 2002;18 (2): 379-402.

D'Andrea, A. D., *et al.*, Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science*. 2007;297:606-609.

Deffenbaugh AM., *et al.*, Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants. *Genet Test*. 2002;6(2):119-21

Deng, C. X., Brodie, S. G., Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *Bioessays*. 2000;22(8):728-737.

Díez, O., *et al.*, Analysis of BRCA1 and BRCA2 Genes in Spanish Breast/Ovarian Cancer Patients: A High Proportion of Mutations Unique to Spain and Evidence of Founder Effects. *Hum. Mut.* 2003;22:301-312

Direcção Geral de Saúde de Portugal: "Guia de Apoio à Mulher com Cancro da Mama" [Internet]. Portugal. 2012. Disponível a partir de: <http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i006361.pdf>

Domchek, S. M. *et al.*, Association of risk-reducing surgery, in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA*. 2010;304(9):967-975.

Duarte, F., *et al.*, Análisis de mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 en pacientes com caáncer de mama y ovario del norte de Portugal y Galicia. *Rev Clin Esp*. 2002;202:259–263

Dufloth, R. M., *et al.*, Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *Revista Paulista de Medicina*. 2005;123:192-197.

Esteves, *et al.*, Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. *BJMBR*. 2009;42:453-457

Ewertz, M., *et al.*, Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer*. 1990;46; 4; 597-603.

Fairfield, K.M., *et al.*, Risk of ovarian carcinoma and consumption of vitamins A, C, and E and specific carotenoids: a prospective analysis. *Cancer*. 2001;92:2318-2326

Fearon, E.R., Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*. 1997;278,1043-50.

Ferla, R., *et al.*, Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. *Annals of Oncology*. 2007;18:93-98.

Fero, M.L., *et al.*, The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature*. 1998;396, 177–180.

Ford, D. *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium-American Journal of Human Genetics. 1998;62:676-689.

Frank, T.S., Hereditary cancer syndromes. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125, 85-90.

Friedman, L.S., *et al.*, Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles, including the founder mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish families. *Am J Hum Genet*. 1995;57:1284–97.

Gayther, S. A., *et al.*, Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidences for a genotype-phenotype correlation. *Nature Genetics*. 1995;11(4):428-433.

Gayther, S. A. *et al.* Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nature Genetics*. 1997;15(1):103- 105.

GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível apartir de: <http://globocan.iarc.fr>

Gomes, M. C. B., *et al.*, Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Research Treatment*. 2007;103:349-353.

Hall, M.J., *et al.*, BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer*. 2009;115(10): 2222-33.

Hatman, A. R., Ford, J. M., BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. *Nature Genetics*. 2002;32:180-184.

Hartmann, L. C., *et al.*, Efficacy of bilateral profilatic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2001;93(21):1633-1637.

Hogervorst, F. B., *et al.*, Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Research*., 2003;63(7):1449-1453.

Honrado, E., *et al.*, Histopathology of BRCA1- and BRCA2-associated breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006;59(1):27-39

Houdayer C, *et al.*, Guidelines for splicing analysis in molecular diagnosis derived from a set of 327 combined in silico/in vitro studies on BRCA1 and BRCA2 variants. *Hum Mutat*. 2012;33(8):1228-38

Janavicus, R., Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA Journal*. 2010

Jemal, A., Siegel, R., *et al.*, Cancer Statistics 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60:277-300.

Johannsson, O.T., *et al.*, Tumour biological features of BRCA1-induced breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 1997;33,362-71.

Kaas, R., *et al.*, Profilatic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: very low risk for subsequent breast cancer. *Annals of Surgery*. 2010;251(3):488-492.

Kelsey, JL; *et al.*, Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev*. 1993;15:36-47

Knudson, A., "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma". *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971;68 (4): 820–823

Kojic, M., *et al.*, The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in *Ustilago maydis*. *Molecular Cell*. 2003;12(4):1043-1049.

Korde, LA., *et al.*, Assessing breast cancer risk: genetic factors are not the whole story. *Postgrad Med*. 2004;116:6-4, 19

Kuhl, C., *et al.*, Prospective multicenter study to refine management recommendations for women at elevated familial risk of breast cancer: the EVA trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(9):450-457.

Kuska, B., *et al.*, Researchers expands genetic epidemiology of BRCA genes. *Journal of the National Cancer Institute*. 1997;89:844-845.

Kwabi-Addo, B., *et al.*, Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001;115:63–11568.

Lakhani, S.R., *et al.*, Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancer involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90:1138-1145.

Le Page, F., *et al.*, BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Research*. 2000;60:5548-5552.

Leach, M.O., *et al.*, Screening with magnetic resonance imaging and mammography of a UK population at high familial risk of breast cancer: a prospective multicentre cohort study (MARIBS). *Lancet*. 2005;365(9473):427-437.

Levitt, N.C., Hickson, I.D. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol Med*. 2002;8:179-186

Lipworth, L., *et al.*, History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:302-312

Lorincz, A.M., Sukumar, S., Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13:279-292

Machado, P.M., Brandão, R.D., Cavaco, B.M., *et al.*, Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. *J Clin Oncol*. 2007;25:2027–2034

Meindl, A., *et al.*, MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. *Human Mutation*. July 2008;29(7):948-958.

Milner, J.B., *et al.*, Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature*. 1997;386:772-773.

Montagna, M., *et al.*, Genomic rearrangements account for more than one-third BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Human Molecular Genetics*. 2003;12(9):1055-1061.

Narod, S.A., Foulkes, W.D., BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nature Reviews*. 2004;4:665-676.

NCCN clinical practice guidelines in oncology – genetic/familial high risk assessment: breast and ovarian. <http://www.nccn.org/>. 2009.

National Institute for health and clinical Excellence (NICE). (2006) Familial breast cancer—NICE clinical guideline 41. www.nice.org.uk.

Osborne C, *et al.*, Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist*, 2004;9:361-377.

Parkin, DM. *et al.*, Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001; 2:533-543

Parkin, D.M., *et al.*, The fraction of cancer attributable to lifestyle and environmental factors in the UK in 2010. Summary and conclusions. *Br J Cancer*, 2011

Parmigiani, G., *et al.*, Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet.* 1998; 62:145–158 12.

[Sem autor], Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancers in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet.* 1997;349(9064):1505-10

Peixoto, A., *et al.*, BRCA1 and BRCA2 germline mutational spectrum and evidence for genetic anticipation in Portuguese breast/ovarian cancer families. *Fam Cancer.* 2006;5:379-387.

Peixoto, A., *et al.*, The c.156_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res Treat (Mar).* 2008;25

Petrij-Bosch, A., *et al.*, BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nature Genetics.* 1997;17:341-345.

Pharoah PD., *et al.*, The genetics of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002;16(4):449-68.

Pischon, T., *et al.*, Obesity and cancer. *Proc Nutr Soc* 2008; 67:128-145

Portal de Oncologia Português, [Internet]. Portugal: 2012. Disponível apartir de: <http://www.pop.eu.com/>

Rijnsburger, AJ., *et al.*, BRCA1-associated breast cancers present differently from BRCA2-associated and familial cases: long-term follow-up of the Dutch MRISC Screening study. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(36):5265-5273.

Sarantaus, L., *et al.*, Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland. *Eur J Hum Genet.* 2000;8:757–63.

Schneegans, S. M., *et al.*, Validation of three BRCA1/2 mutation-carrier probability models Myriad, BRCAPRO and BOADICEA in a population-based series of 183 German families. *Familial Cancer*. 2012; 11:181–188.

Schmidt, L., *et al.*, Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet*. 1997;16, 68-73.

Soares, R., *et al.*, Análise de mutações no gene BRCA1 em doentes com cancro da mama e/ou ovário em Portugal. *Ata Med Port*. 2000;13:313–321

Sobol, H., *et al.*, Accessing the risk of BRCA1-associated breast cancer using individual morphologic criteria. *Histopathology*. 2001;38:378-379.

Szabo, Cl., King, MC., Inherited breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*. 1995;4:1811-1817.

Tavassoli, FA., Devilee, P., *Pathology & Genetics - Tumours of Breast and Female Genital Organs*. IARCPress. 2003

Turner, N., Tutt, A., *et al.*, Hallmarks of BRCAness in sporadic cancers. *Nature Review. Cancer*. 2004;4(10):814-819.

Tutt, A., *et al.*, Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet*. 2010;376(9737):235-244.

TwoRoger, SS., *et al.*, A prospective study of plasma prolactin concentrations and risk of premenopausal and postmenopausal breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;25:1482-8

Van der Hout, AH., *et al.*, A DGGE system for comprehensive mutation screening of BRCA1 and BRCA2. Application in a Dutch cancer clinic setting. *Hum Mutat*. 2006

Van der Velde, NM., *et al.*, Time to stop ovarian cancer screening in BRCA1/2 mutation carriers?. *International Journal of Cancer*. 2009;124(4):919-923.

Veronesi, U., *et al.*, Avoiding axillary dissection in breast cancer surgery: a randomized trial to assess the role of axillary radiotherapy. *Ann Oncol*. 2005;16:383-388

Venkatachalam, S., *et al.*, Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J.* 1998;17,4657–4667.

VI Reunião de Consenso Nacional do Cancro da Mama [Internet]. Luso, Portugal: Sociedade Portuguesa de Senologia; 2008. Disponível apartir de:

<http://www.spsenologia.pt/wp-content/uploads/2008/07/vi-reuniao-de-consenso-nacional-do-cancro-da-mama.pdf>

Walsh, T., *et al.*, Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer. JAMA. 2006;295:1379-1388.

Wang, Y., *et al.*, BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. Genes & Development. 2000;14:927-939.

Weiss, JR., *et al.*, Epidemiology of male breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005;14:20–26.

Wu, L. C., *et al.*, Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. Nature Genetics. 1996;14:430-440.

Xu, X., *et al.*, Centrosome amplification and a defective G2-M cell-cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. Molecular Cell. 1999;3:389-395.

Yarden, RI., *et al.*, BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. Nature Genetics. 2002;30(3):285-289.

Zhu, H., *et al.*, Oral contraceptive use and risk of breast cancer: A meta-analysis of prospective cohort studies. Eur J Contracept Reprod Health Care. 2012; 17(6):402-14

Zuo, L., *et al.*, Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. Nat Genet. 1996;12,97-9.

ANEXOS

Reações de amplificação

BRCA1:

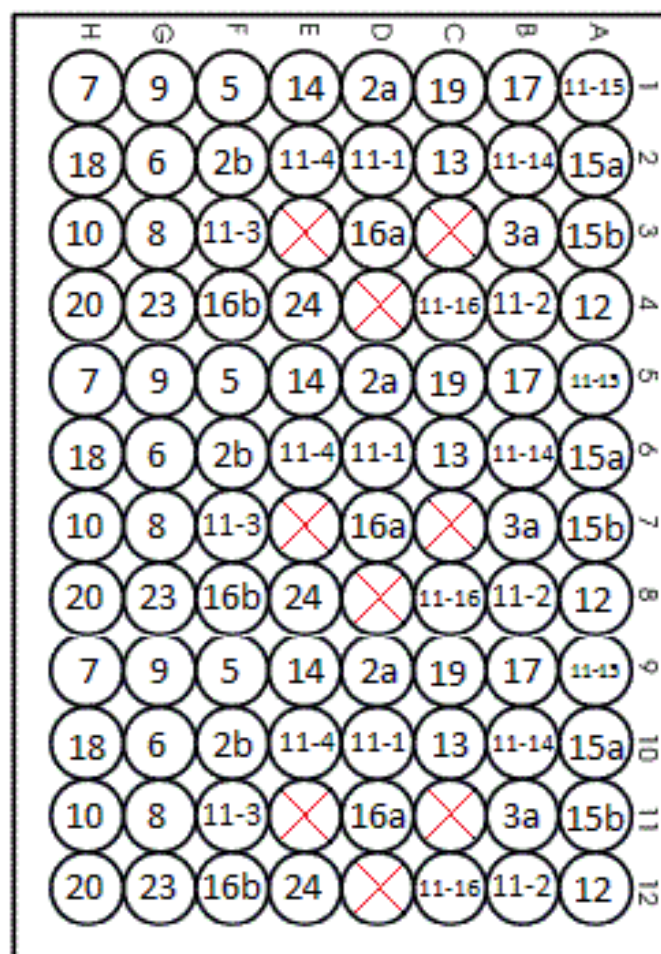


Figura 8 - Esquema de amplificação de parte do gene BRCA1

BRCA1-Exão 11:

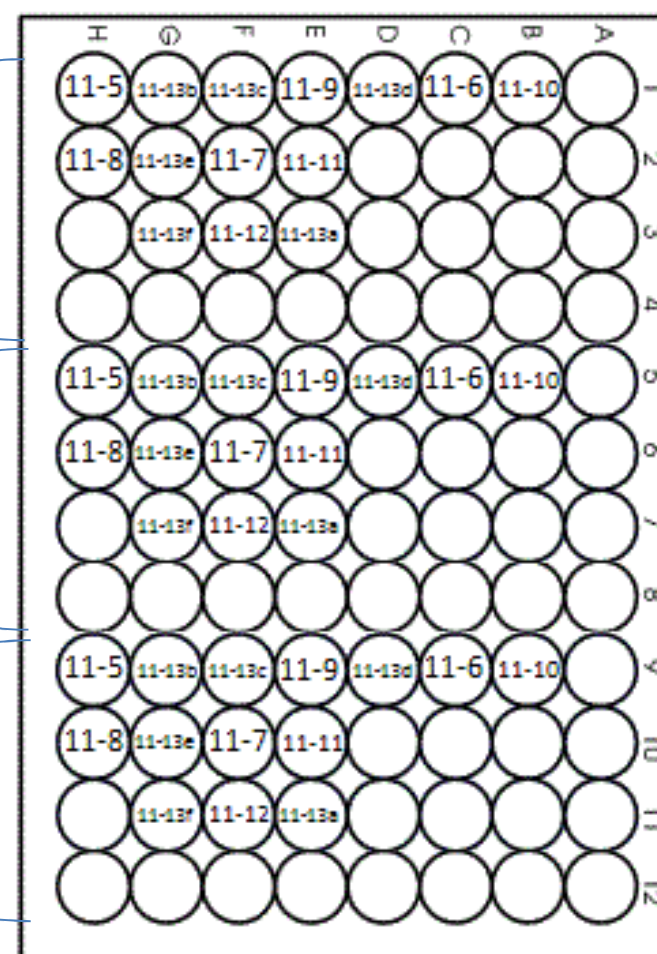


Figura 7 - Esquema de amplificação de parte do gene BRCA1-Exão 11

Reações de amplificação

BRCA2:

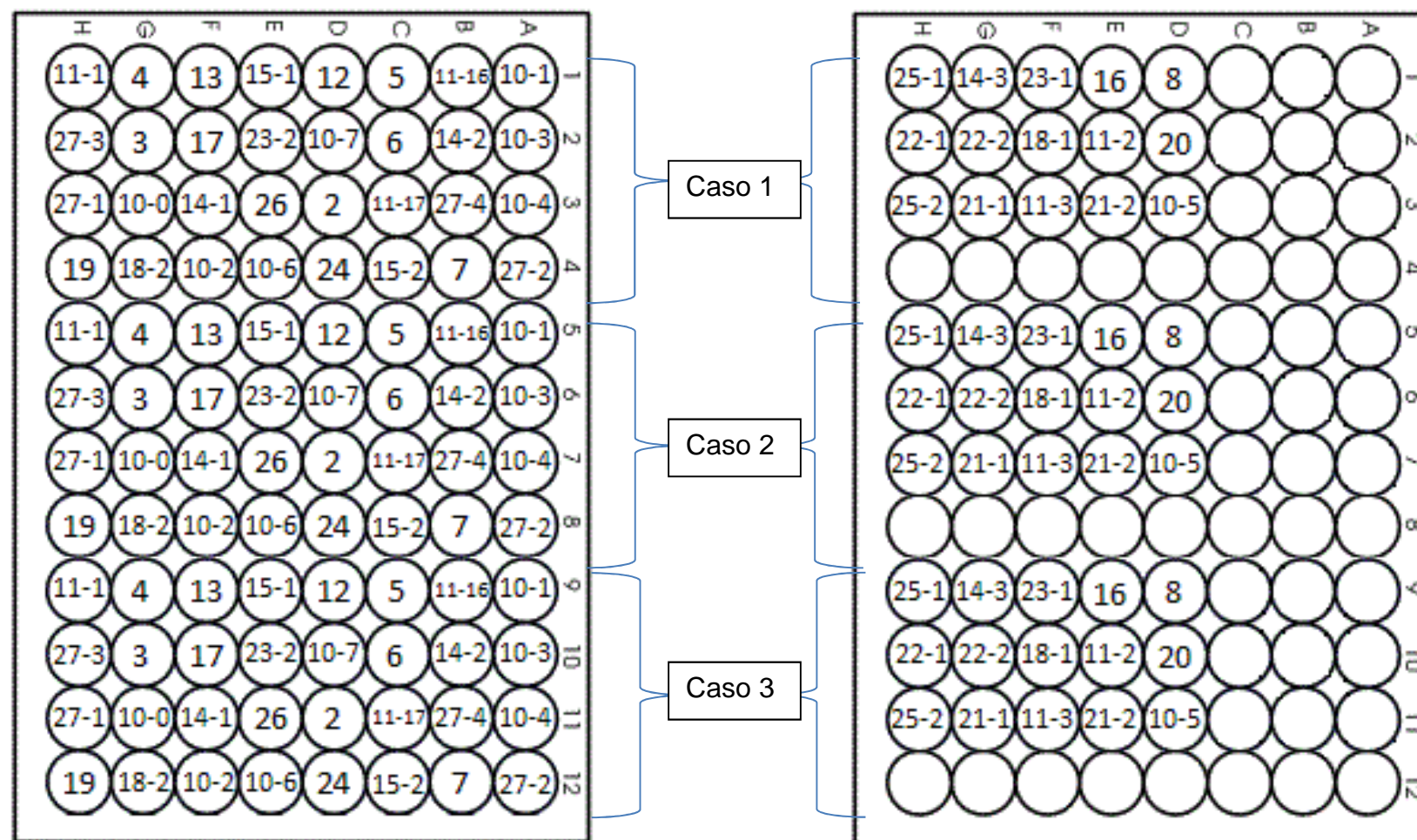


Figura 10 - Esquema de amplificação de parte do gene BRCA2

Figura 9 - Esquema de amplificação de parte do gene BRCA1 (continuação)

Reações de amplificação

BRCA2-Exão 11:

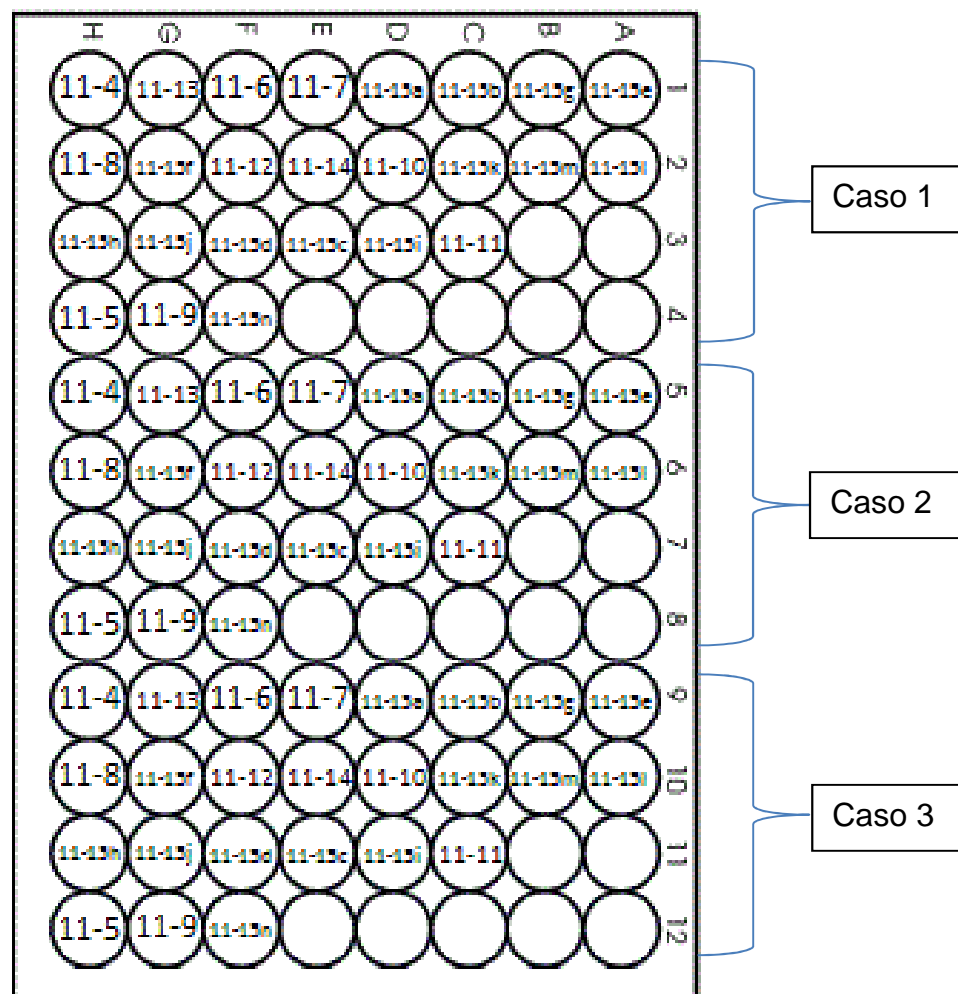


Figura 11 - Esquema de amplificação de parte do gene BRCA2-Exão 11

Pools para o gene BRCA1:

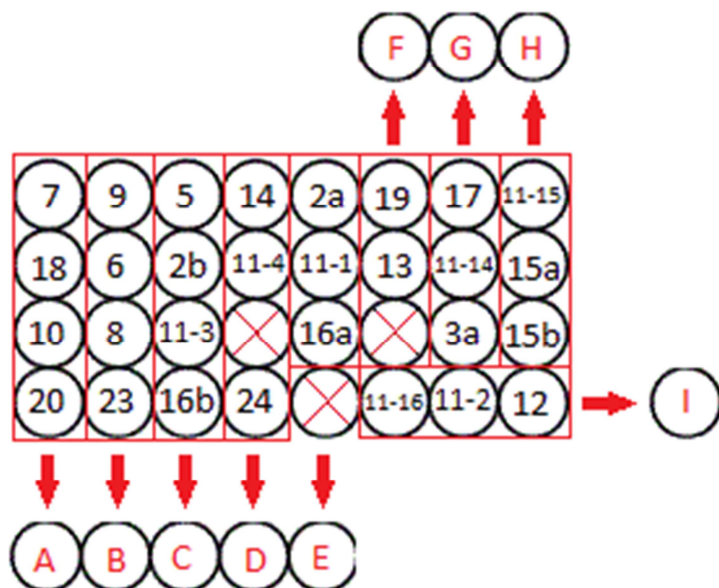


Figura 13 - Pools para o gene BRCA1

Pools para as misturas de polimorfismos (BRCA1):

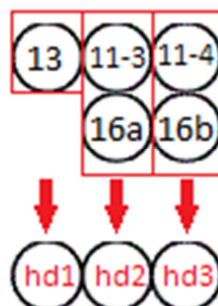


Figura 15 – Pools para as misturas de SNP's do gene BRCA1

Pools para o gene BRCA1-Exão 11:

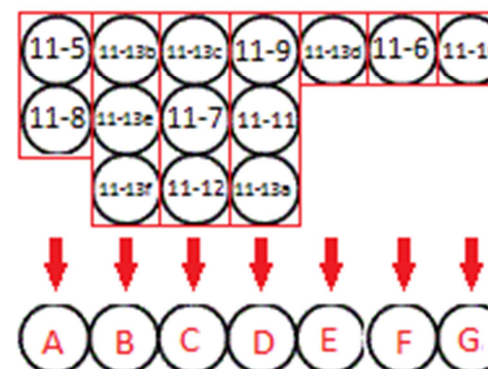


Figura 12 - Pools para o gene BRCA1-Exão 11

Pools para as misturas de polimorfismos (BRCA1-Exão11):



Figura 14 – Pools para as misturas de SNP's do gene BRCA1-Exão 11

Pools para o gene BRCA2:

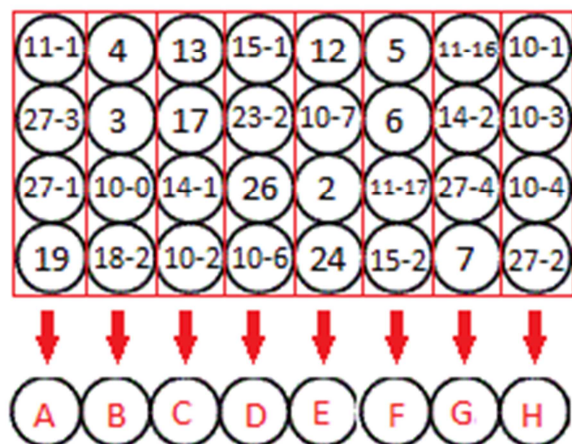


Figura 16 – Pools para o gene BRCA2

Pools para as misturas de polimorfismos (BRCA2):

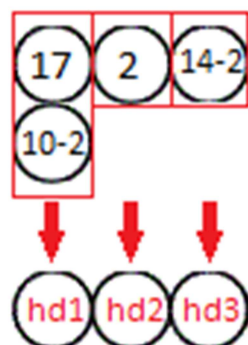


Figura 18 – Pools para as misturas de SNP's para o gene BRCA2

Pools para o gene BRCA2 (continuação):

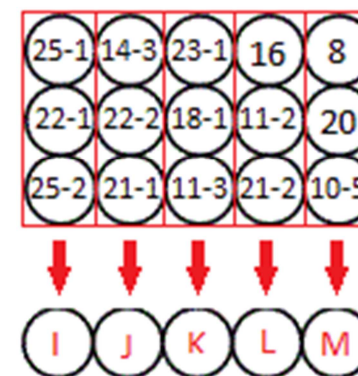


Figura 17 – Pools para o gene BRCA2 (continuação)

Pools para o gene BRCA2-Exão 11:

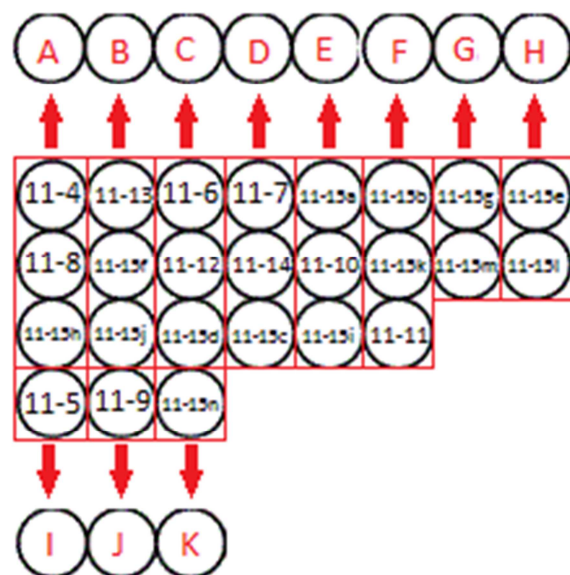


Figura 20 – Pools para o gene BRCA2-Exão 11

Pools para as misturas de polimorfismos (BRCA2- Exão 11):

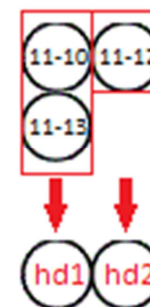


Figura 19 – Pools para as misturas de SNP's para o gene BRCA2-Exão 11

| Length (nt) | SALSA MLPA probe | Chromosomal position | |
|--------------|--------------------------|----------------------|---------|
| | | Control | BRCA1 |
| 64-70-76-82* | DQ-control fragments | | |
| 88-92-96** | DD-control fragments | | |
| | | | |
| 127 | Control probe 0797-L0093 | 5q31 | |
| 136 | Control probe 0662-L0158 | 6p21 | |
| 148 | BRCA1 probe 0763-L0268 | | exon 1A |
| 157 | BRCA1 probe 0764-L0269 | | exon 1B |
| 166 | BRCA1 probe 0765-L0270 | | exon 2 |
| 175 | BRCA1 probe 0826-L0341 | | exon 3 |
| 184 | BRCA1 probe 0767-L0272 | | exon 5 |
| 198 | Control probe 2946-L3265 | 7q | |
| 208 | BRCA1 probe 0827-L0342 | | exon 6 |
| 217 | BRCA1 probe 0769-L0274 | | exon 7 |
| 226 | BRCA1 probe 1004-L0569 | | exon 8 |
| 235 | BRCA1 probe 1005-L0581 | | exon 9 |
| 244 | BRCA1 probe 0772-L0277 | | exon 10 |
| 256 | Control probe 0518-L0098 | 2q14 | |
| 268 | BRCA1 probe 0830-L0345 | | exon 11 |
| 277 | BRCA1 probe 0774-L0279 | | exon 11 |
| 286 | BRCA1 probe 0775-L0280 | | exon 12 |
| 295 | BRCA1 probe 2603-L2074 | | exon 13 |
| 304 | BRCA1 probe 0833-L0349 | | exon 14 |
| 316 | Control probe 0495-L0303 | 12p12 | |
| 328 | BRCA1 probe 0778-L0347 | | exon 15 |
| 337 | BRCA1 probe 0779-L0003 | | exon 16 |
| 346 | BRCA1 probe 0780-L0283 | | exon 17 |
| 355 | BRCA1 probe 0781-L0284 | | exon 18 |
| 364 | BRCA1 probe 0782-L0285 | | exon 19 |
| 376 | Control probe 0655-L0304 | 4q26 | |
| 388 | BRCA1 probe 0783-L0356 | | exon 20 |
| 397 | BRCA1 probe 0784-L0287 | | exon 21 |
| 406 | BRCA1 probe 0785-L0288 | | exon 22 |
| 415 | BRCA1 probe 0786-L0289 | | exon 23 |
| 424*** | BRCA1 probe 2831-L2260 | | exon 24 |
| 436 | Control probe 0596-L0083 | 11p13 | |
| 445 | Control probe 0678-L0124 | 12p13 | |
| 454 | Control probe 0673-L0117 | 3p21 | |

Tabela 9 - Sondas referentes a SALSA MLPA kit P002B1.

| Length (nt) | SALSA MLPA probe | Chromosomal position | |
|-------------|---|----------------------|---------|
| | | reference | BRCA1 |
| 64-70-76-82 | Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA | | |
| 88-92-96 | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation | | |
| 100 | X-fragment: Specific for the X chromosome | | |
| 105 | Y-fragment: Specific for the Y chromosome | | |
| 127 | Reference probe 00797-L00093 | 5q31 | |
| 136 * | Reference probe 06452-L05978 | 6p22 | |
| 148 | BRCA1 probe 00763-L00268 | | exon 1A |
| 157 | BRCA1 probe 00764-L00269 | | exon 1B |
| 166 | BRCA1 probe 00765-L00270 | | exon 2 |
| 175 | BRCA1 probe 00826-L00341 | | exon 3 |
| 184 | BRCA1 probe 00767-L00272 | | exon 5 |
| 198 | Reference probe 02946-L03265 | 7q31 | |
| 208 | BRCA1 probe 00827-L00342 | | exon 6 |
| 216 | BRCA1 probe 00769-L00274 | | exon 7 |
| 226 | BRCA1 probe 01004-L00569 | | exon 8 |
| 236 | BRCA1 probe 01005-L00581 | | exon 9 |
| 244 | BRCA1 probe 00772-L00277 | | exon 10 |
| 256 | Reference probe 00518-L00098 | 2q13 | |
| 266 | BRCA1 probe 00830-L00345 | | exon 11 |
| 277 | BRCA1 probe 00774-L00279 | | exon 11 |
| 285 | BRCA1 probe 00775-L00280 | | exon 12 |
| 295 ± | BRCA1 probe 02603-L02074 | | exon 13 |
| 305 | BRCA1 probe 00833-L00349 | | exon 14 |
| 316 | Reference probe 00495-L00303 | 12p12 | |
| 328 | BRCA1 probe 00778-L00347 | | exon 15 |
| 337 | BRCA1 probe 00779-L00003 | | exon 16 |
| 346 | BRCA1 probe 00780-L00283 | | exon 17 |
| 355 ± | BRCA1 probe 00781-L00284 | | exon 18 |
| 364 | BRCA1 probe 00782-L00285 | | exon 19 |
| 374 | Reference probe 00655-L00304 | 4q26 | |
| 389 | BRCA1 probe 00783-L00356 | | exon 20 |
| 399 ¥ | BRCA1 probe 00784-L12004 | | exon 21 |
| 407 | BRCA1 probe 00785-L00288 | | exon 22 |
| 415 | BRCA1 probe 00786-L00289 | | exon 23 |
| 427 ¥ | BRCA1 probe 02831-L13862 | | exon 24 |
| 436 | Reference probe 00596-L00083 | 11p13 | |
| 445 * | Reference probe 04074-L03710 | 17q11 | |
| 454 | Reference probe 00673-L00117 | 3p21 | |
| 463 *± | BRCA1 probe 11283-L12001 | | exon 13 |

Tabela 10 - Sondas referentes a SALSA MLPA kit P002C1.

| Length (nt) | SALSA MLPA probe | Chromosomal position |
|--------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 64-70-76-82* | DQ-control fragments | |
| 88-92-96** | DD-control fragments | |
| | | |
| 130 | Control probe 2269-L1761 | 01p36 |
| 139 | Control probe 2283-L1774 | 13q12 (<i>BRCA2, exon 1</i>) |
| 148 | BRCA1 probe 2807-L1268 | Exon 1 |
| 157 | BRCA1 probe 2808-L2168 | Exon 1 |
| 166 | BRCA1 probe 2810-L2239 | Exon 2 |
| 175 | BRCA1 probe 2811-L2240 | Exon 3 |
| 184 | BRCA1 probe 3398-L2254 | Exon 18 |
| 193 | Control probe 3217-L2642 | 10q25 |
| 199 | BRCA1 probe 3823-L3286 | Exon 22 |
| 208 | BRCA1 probe 2813-L2242 | Exon 6 |
| 217 | BRCA1 probe 2814-L2243 | Exon 7 |
| 226 | BRCA1 probe 2815-L2244 | Exon 8 |
| 235 | BRCA1 probe 2816-L2245 | Exon 9 |
| 244 | BRCA1 probe 3411-L2074 | Exon 13 |
| 256 | Control probe 2279-L1770 | 13q12 (<i>BRCA2, exon 11</i>) |
| 265 | BRCA1 probe 3772-L3269 | Exon 14 |
| 277 | BRCA1 probe 2818-L2247 | Exon 11 |
| 286 | BRCA1 probe 2819-L2248 | Exon 12 |
| 295 | BRCA1 probe 3890-L3337 | Exon 13 |
| 310 | Control probe 1609-L1191 | 13q12 (<i>BRCA2, exon 14</i>) |
| 319 | Control probe 0495-L3128 | 12p12 |
| 328 | BRCA1 probe 2821-L2250 | Exon 15 |
| 337 | BRCA1 probe 2822-L2251 | Exon 16 |
| 346 | BRCA1 probe 3395-L2241 | Exon 5 |
| 355 | BRCA1 probe 3822-L3285 | Exon 10 |
| 364 | BRCA1 probe 2826-L2255 | Exon 19 |
| 373 | Control probe 2667-L2134 | 11q23 (<i>ATM, exon 25</i>) |
| 380 | Control probe 0655-L3268 | 4q26 |
| 388 | BRCA1 probe 2827-L2256 | Exon 20 |
| 397 | BRCA1 probe 2828-L2257 | Exon 21 |
| 406 | BRCA1 probe 3397-L2253 | Exon 17 |
| 415 | BRCA1 probe 2830-L2259 | Exon 23 |
| 424 | BRCA1 probe 2831-L2260 | Exon 24 |
| 436 | BRCA1 probe 2100-L1269 | Exon 1 |
| 445 | Control probe 2445-L1409 | 16p13 |
| 454 | Control probe 2355-L1415 | 9q34 |

Tabela 11 - Sondas referentes a SALSA MLPA kit P087

| Length (nt) | SALSA MLPA probe | Chromosomal position | BRCA2 exon |
|--------------|----------------------------------|----------------------|--------------------|
| 64-70-76-82* | DQ-control fragments | | |
| 88-92-96* | DD-control fragments | | |
| | | | |
| 130 | <i>Control probe 0797-L00463</i> | <i>5q31</i> | |
| 137 | BRCA2 probe 2283-L01774 | | exon 1 |
| 148 | BRCA2 probe 2285-L01776 | | exon 1 |
| 154** | BRCA2 probe 9297-L08066 | | exon 14 |
| 161 | <i>FRY probe 2143-L09586</i> | | 20 Kb before BRCA2 |
| 166 | BRCA2 probe 2486-L01985 | | exon 2 |
| 170** | BRCA2 probe 8898-L09587 | | exon 3 |
| 177 | BRCA2 probe 1599-L10642 | | exon 3 |
| 184 | <i>Control probe 1217-L00694</i> | <i>4q</i> | |
| 191** | BRCA2 probe 9812-L10643 | | exon 23 |
| 197 | BRCA2 probe 1600-L04671 | | exon 4 |
| 202** | BRCA2 probe 8265-L08128 | | exon 7 |
| 211 | <i>Control probe 1344-L00555</i> | <i>9q</i> | |
| 220 | BRCA2 probe 1602-L01184 | | exon 8 |
| 229 | BRCA2 probe 1603-L01185 | | exon 9 |
| 238 | <i>Control probe 0517-L00097</i> | <i>2q</i> | |
| 247 | BRCA2 probe 1604-L01186 | | exon 10 |
| 256 | BRCA2 probe 2279-L01770 | | exon 11 start |
| 265** | <i>Control probe 2318-L01809</i> | <i>19p</i> | |
| 274 | BRCA2 probe 1606-L01188 | | exon 11 end |
| 283 | BRCA2 probe 1607-L01189 | | exon 12 |
| 292 | <i>Control probe 0990-L00567</i> | <i>11q</i> | |
| 301 | BRCA2 probe 2280-L01771 | | exon 13 |
| 310** | BRCA2 probe 9809-L10257 | | exon 5 |
| 319** | BRCA2 probe 9296-L11090 | | exon 27 |
| 328 | BRCA2 probe 1610-L01192 | | exon 15 |
| 337 | BRCA2 probe 1611-L01193 | | exon 16 |
| 346 | BRCA2 probe 4585-L03983 | | exon 6 |
| 355 | BRCA2 probe 2281-L01772 | | exon 17 |
| 364 | BRCA2 probe 1613-L01195 | | exon 18 |
| 373** | <i>Control probe 2667-L04984</i> | <i>11q</i> | |
| 382 | BRCA2 probe 1614-L01196 | | exon 19 |
| 391** | BRCA2 probe 8266-L08129 | | exon 20 |
| 400** | <i>Control probe 0801-L00639</i> | <i>13q</i> | |
| 409 | BRCA2 probe 2069-L01970 | | exon 21 |
| 418 | BRCA2 probe 1617-L01199 | | exon 22 |
| 427 | <i>Control probe 1108-L00679</i> | <i>8q</i> | |
| 436** | BRCA2 probe 8267-L08130 | | exon 24 |
| 445** | BRCA2 probe 8268-L08131 | | exon 25 |
| 454 | <i>CG018 probe 2144-L01619</i> | | 9 Kb after BRCA2 |
| 463 | BRCA2 probe 4586-L03984 | | exon 26 |
| 472** | BRCA2 probe 9293-L09584 | | exon 27 |
| 481 | <i>Control probe 1060-L00628</i> | <i>17q</i> | |

Tabela 12 - Sondas referentes a SALSA MLPA kit P090A2

| Length (nt) | SALSA MLPA probe | Chromosomal position reference | BRCA2 |
|-------------|---|--------------------------------|-----------------|
| 64-70-76-82 | Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA | | |
| 88-92-96 | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation | | |
| 100 | X-fragment: Specific for the X chromosome | | |
| 105 | Y-fragment: Specific for the Y chromosome | | |
| 124 | Reference probe 04235-L08770 | 8p22 | |
| 130 | BRCA2 probe 12289-L13282 | | Exon 11 |
| 136 | Reference probe 09938-L10397 | 8q13 | |
| 148 | BRCA2 probe 02072-L01127 | | Exon 1 |
| 154 | BRCA2 probe 12290-L13283 | | Exon 6 |
| 160 | BRCA2 probe 12291-L13284 | | Exon 11 |
| 166 | BRCA2 probe 12292-L14535 | | Exon 27 |
| 172 | Reference probe 4114-L03474 | 9q34 | |
| 178 | BRCA2 probe 12294-L13287 | | Exon 4 |
| 184 | BRCA2 probe 12295-L13288 | | Exon 26 |
| 190 | BRCA2 probe 09811-L10259 | | Exon 23 |
| 196 | BRCA2 probe 12296-L13289 | | Exon 11 |
| 202 | BRCA2 probe 12297-L13290 | | Exon 8 |
| 208 | Reference probe 03225-L14390 | 5q35 | |
| 214 | BRCA2 probe 12299-L13292 | | Exon 12 |
| 220 | BRCA2 probe 12300-L13293 | | Exon 16 |
| 226 | BRCA2 probe 12301-L14436 | | Exon 9 |
| 232 | BRCA2 probe 12302-L13295 | | Exon 19 |
| 238 | BRCA2 probe 12303-L13296 | | Exon 17 |
| 244 | BRCA2 probe 12304-L13297 | | Exon 4 |
| 250 | Reference probe 02658-L02125 | 11q23 | |
| 256 | BRCA2 probe 12305-L14344 | | Exon 3 |
| 265 | BRCA2 probe 12306-L13299 | | Exon 7 |
| 274 | BRCA2 probe 12307-L13300 | | Exon 18 |
| 283 | BRCA2 probe 12308-L13301 | | Exon 25 |
| 292 | BRCA2 probe 08343-L08275 | | Upstream exon 1 |
| 301 | BRCA2 probe 12309-L13302 | | Exon 21 |
| 310 | BRCA2 probe 12310-L13303 | | Exon 27 |
| 319 | Reference probe 10677-L11259 | 6p12 | Exon 29 |
| 328 | BRCA2 probe 12312-L13305 | | Exon 13 |
| 337 | BRCA2 probe 12313-L13306 | | Exon 5 |
| 346 | BRCA2 probe 12314-L13307 | | Exon 13 |
| 355 | BRCA2 probe 12315-L13308 | | Exon 10 |
| 364 | BRCA2 probe 12316-L13309 | | Exon 16 |
| 373 | Reference probe 11001-L11672 | 4q22 | |
| 382 | BRCA2 probe 12318-L13311 | | Exon 21 |
| 391 | BRCA2 probe 12319-L13312 | | Exon 8 |
| 400 | BRCA2 probe 12320-L13313 | | Exon 12 |
| 409 | BRCA2 probe 12321-L13314 | | Exon 20 |
| 418 | BRCA2 probe 12322-L13315 | | Exon 15 |
| 427 | BRCA2 probe 12323-L13316 | | Exon 2 |
| 437 | BRCA2 probe 01618-L14536 | | Exon 24 |
| 445 | Reference probe 09612-L09907 | 20p12 | |
| 454 | BRCA2 probe 12324-L13317 | | Exon 14 |
| 463 | BRCA2 probe 12325-L13318 | | Exon 18 |
| 472 | BRCA2 probe 12326-L13319 | | Exon 8 |
| 481 | Reference probe 09772-L10187 | 15q21 | |

Tabela 13 - Sondas referentes a SALSA MLPA kit P077

BRCA1:

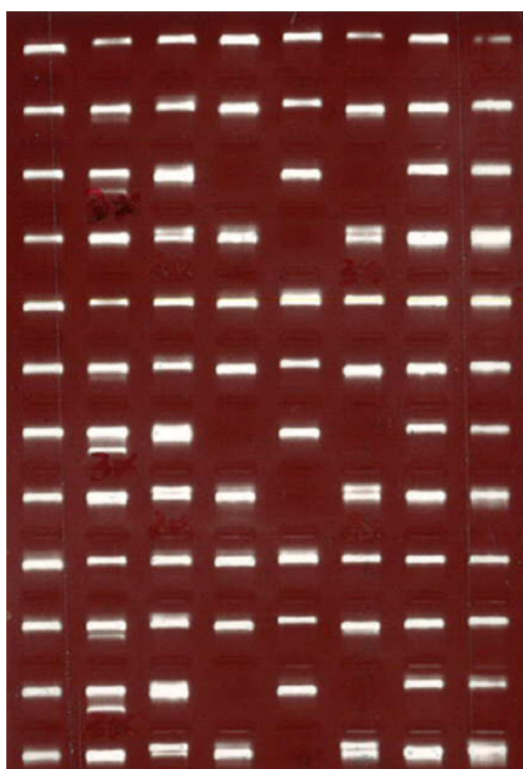


Ilustração 2 - Resultado da amplificação do gene BRCA1

BRCA1 – Exão 11:

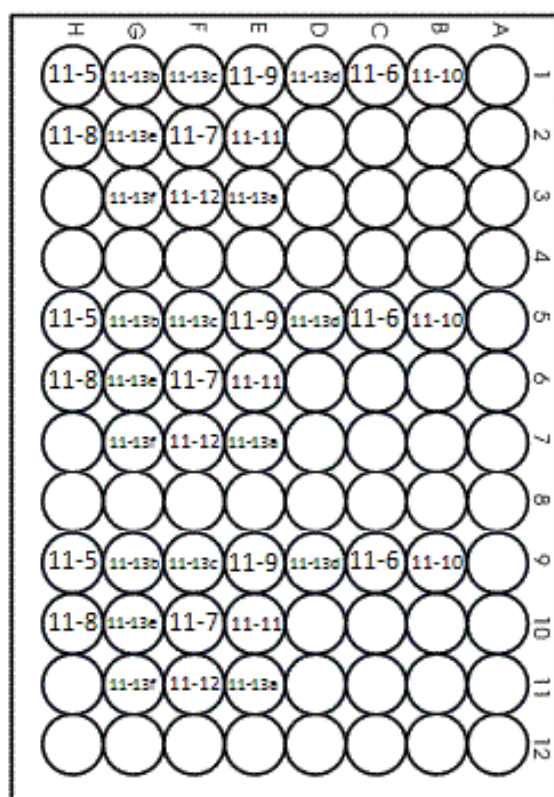
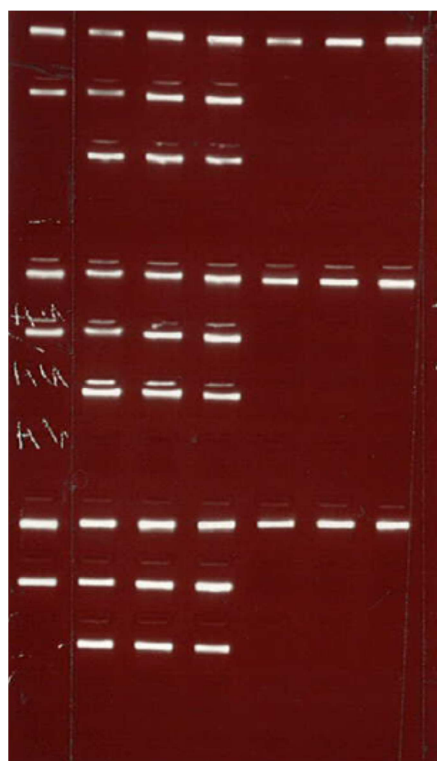


Ilustração 1 - Resultado da amplificação do gene BRCA1 - Exão 11

BRCA2:

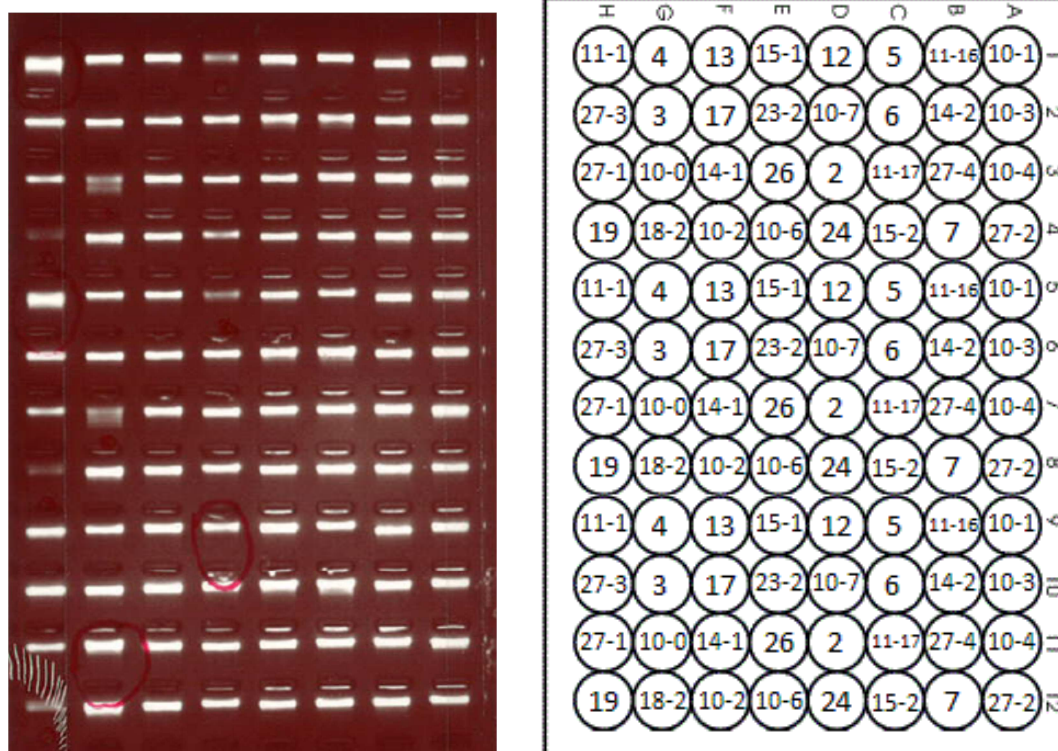


Ilustração 3 - Resultado da amplificação do gene BRCA2

BRCA2 (continuação):

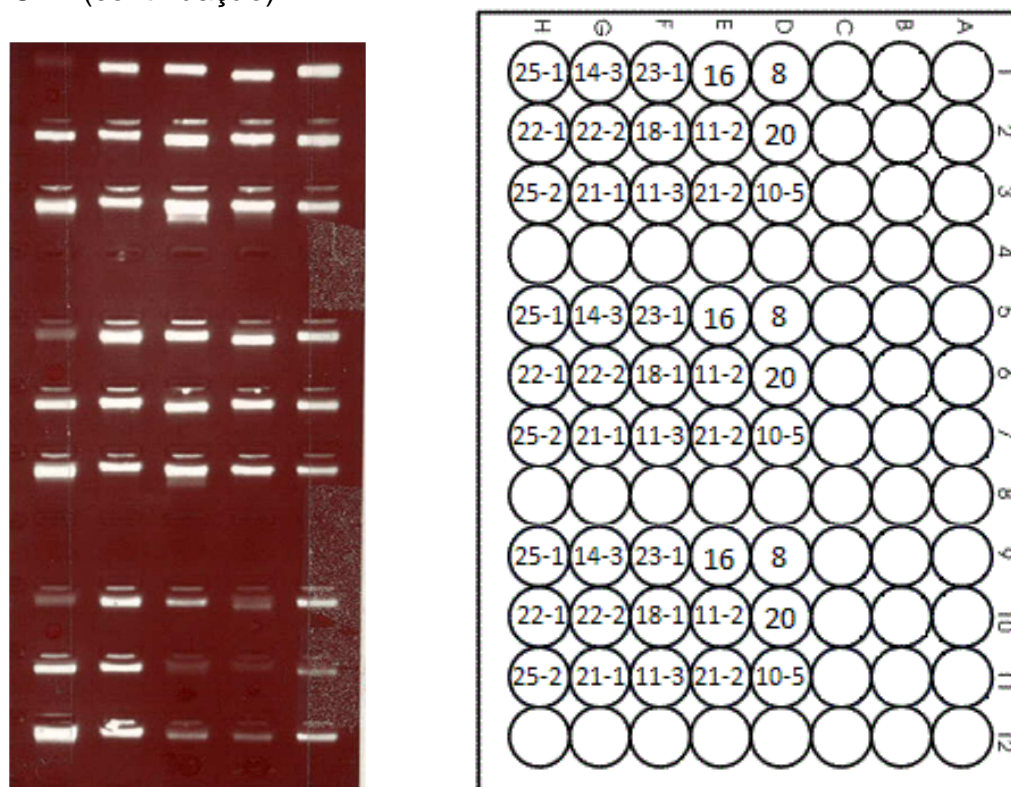
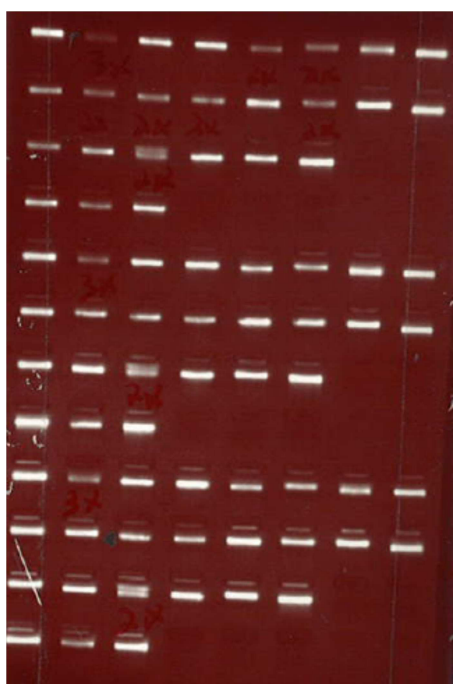


Ilustração 4 - Resultado da amplificação do gene BRCA2 (continuação)

BRCA2 – Exão 11:



| I | Q | F | M | D | C | B | A | |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|
| 11-4 | 11-13 | 11-6 | 11-7 | 11-13e | 11-13e | 11-13g | 11-13e | 1 |
| 11-8 | 11-13f | 11-12 | 11-14 | 11-10 | 11-13e | 11-13m | 11-13i | 2 |
| 11-13e | 11-13j | 11-13e | 11-13e | 11-13i | 11-11 | | | 3 |
| 11-5 | 11-9 | 11-13e | | | | | | 4 |
| 11-4 | 11-13 | 11-6 | 11-7 | 11-13e | 11-13e | 11-13g | 11-13e | 5 |
| 11-8 | 11-13f | 11-12 | 11-14 | 11-10 | 11-13e | 11-13m | 11-13i | 6 |
| 11-13e | 11-13j | 11-13e | 11-13e | 11-13i | 11-11 | | | 7 |
| 11-5 | 11-9 | 11-13e | | | | | | 8 |
| 11-4 | 11-13 | 11-6 | 11-7 | 11-13e | 11-13e | 11-13g | 11-13e | 9 |
| 11-8 | 11-13f | 11-12 | 11-14 | 11-10 | 11-13e | 11-13m | 11-13i | 10 |
| 11-13e | 11-13j | 11-13e | 11-13e | 11-13i | 11-11 | | | 11 |
| 11-5 | 11-9 | 11-13e | | | | | | 12 |

Ilustração 5 - Resultado da amplificação do gene BRCA2-Exão 11

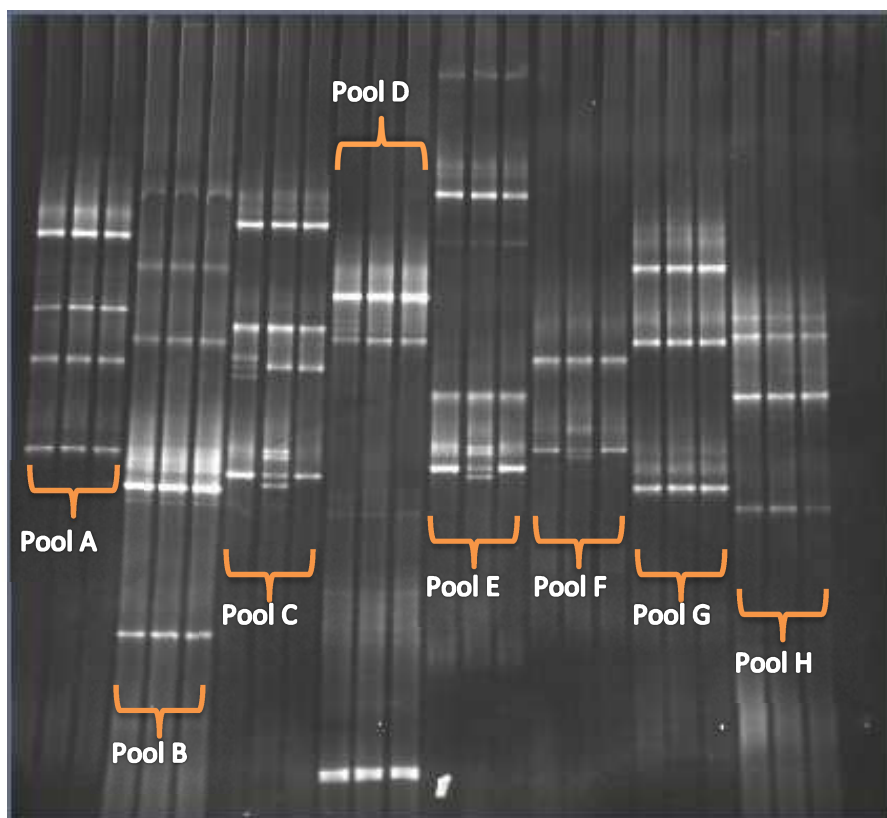


Ilustração 6 - Resultado de um Gel de DGGE do gene BRCA1

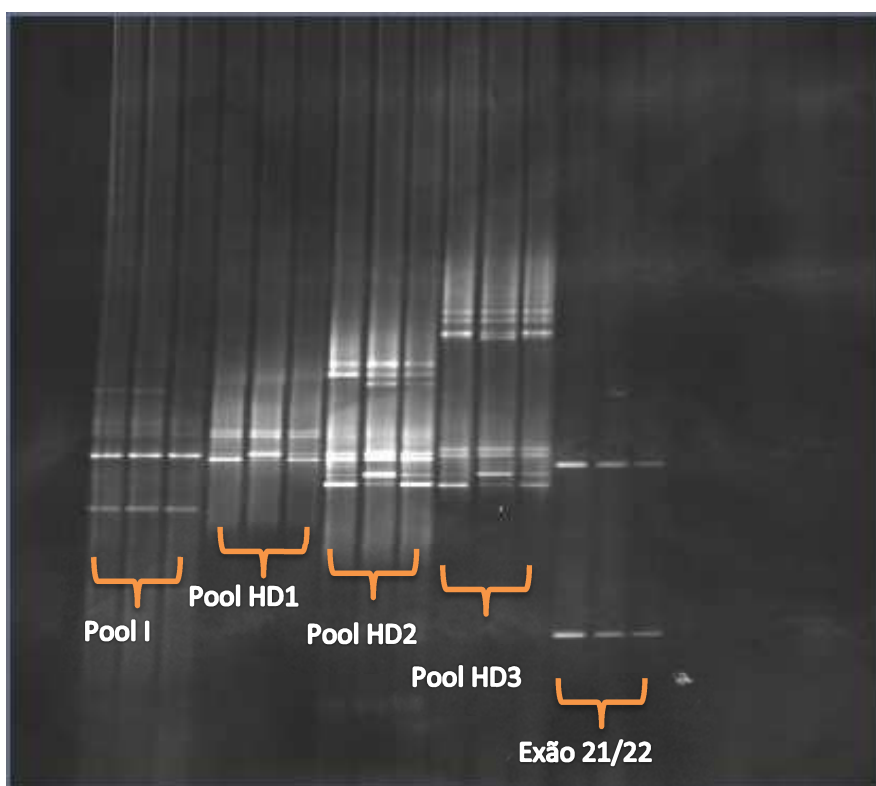


Ilustração 7 - Resultado de um Gel de DGGE do gene BRCA1 (continuação)

BRCA1 – Exão 11:

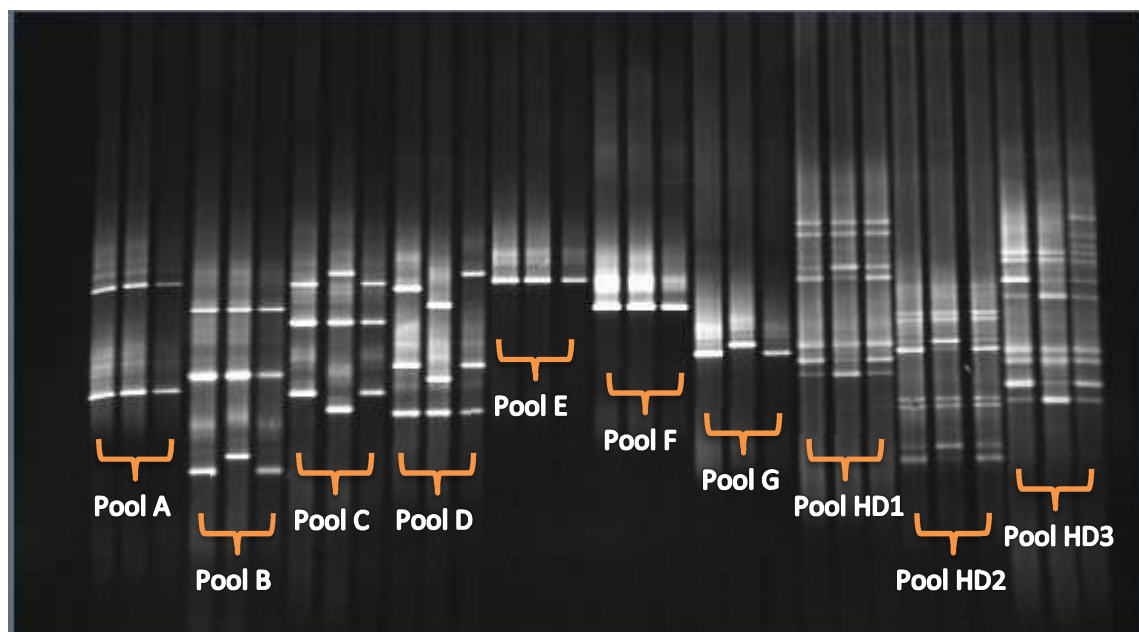


Ilustração 8 - Resultado de um Gel de DGGE do gene BRCA1-Exão 11

BRCA2:

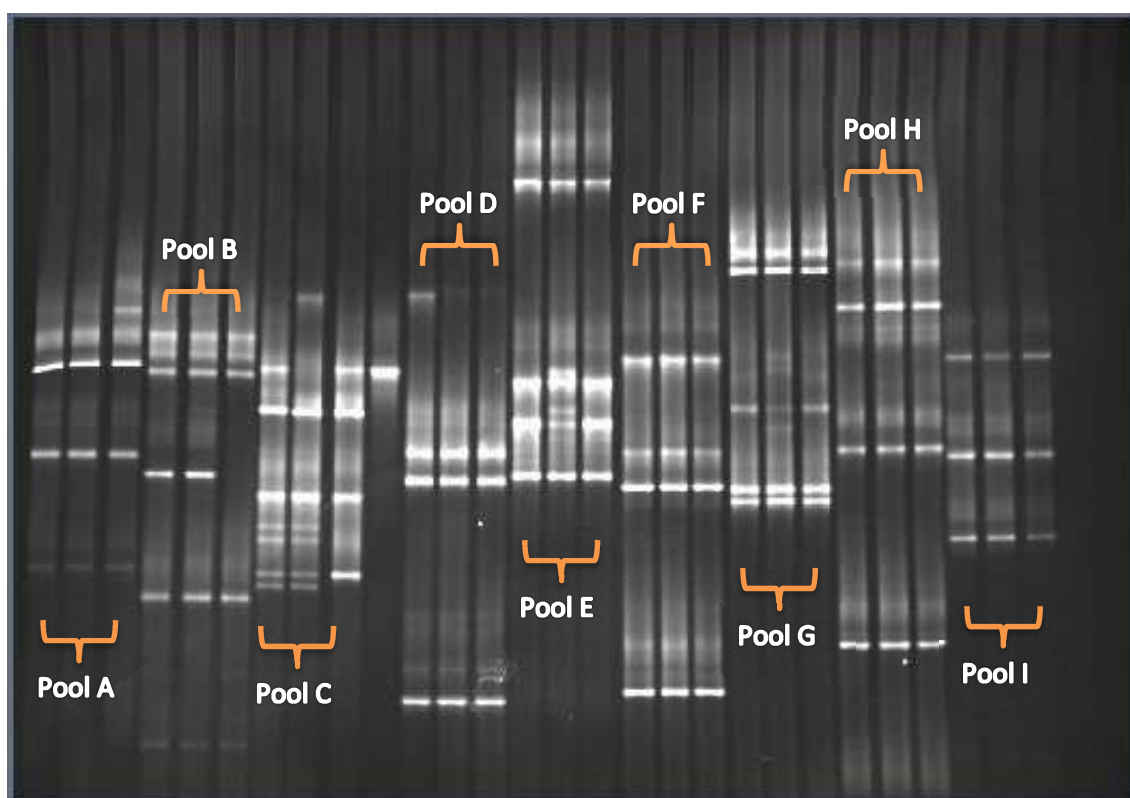


Ilustração 9 - Resultado de um Gel de DGGE do gene BRCA2

BRCA2 (continuação):

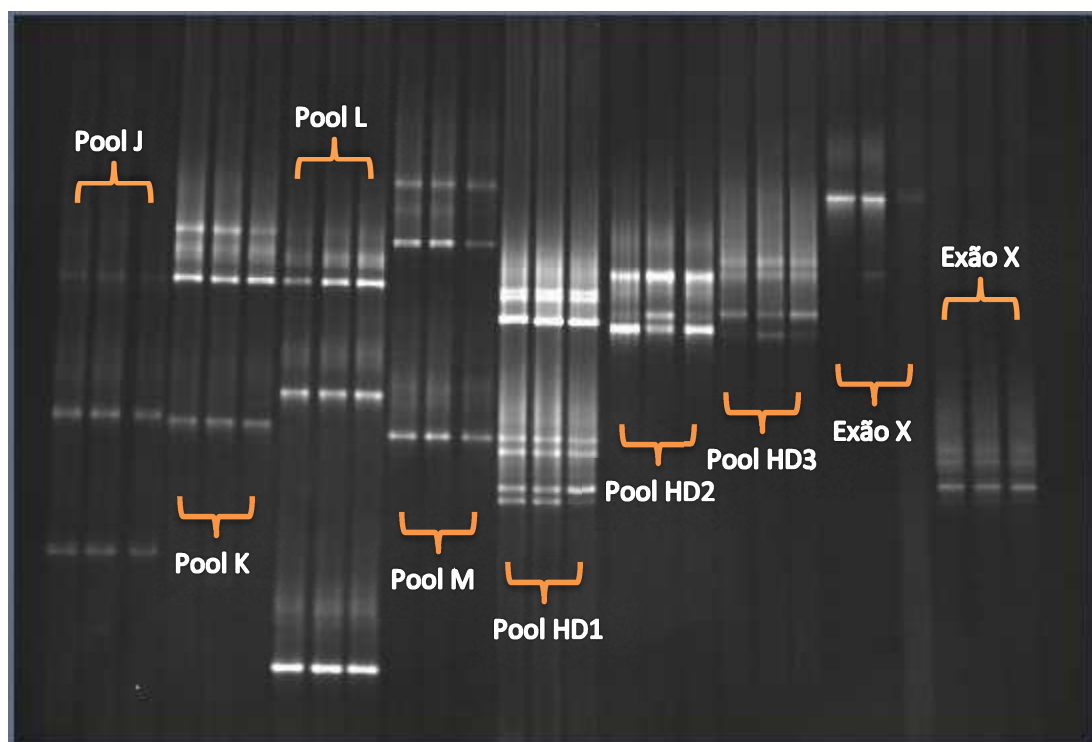


Ilustração 10 - Resultado de um Gel de DGGE do gene BRCA2 (continuação)

BRCA2 – Exão 11:

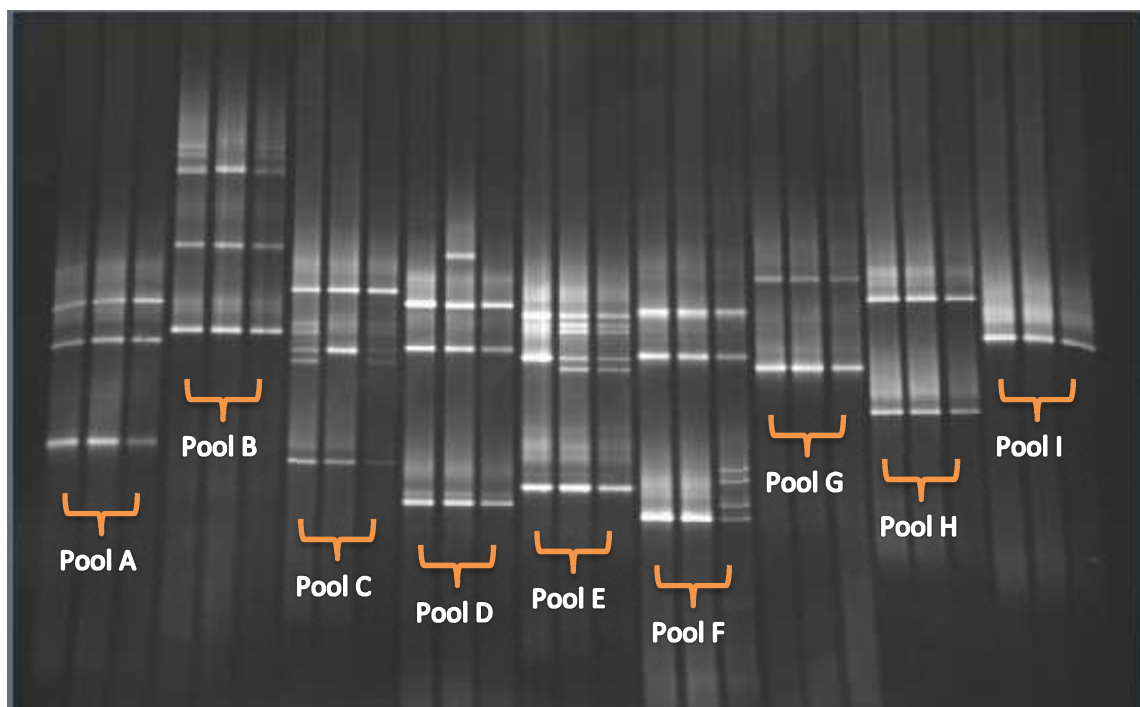


Ilustração 11 - Resultado de um Gel de DGGE do gene BRCA2-Exão 11

BRCA2 – Exão 11 (Continuação):

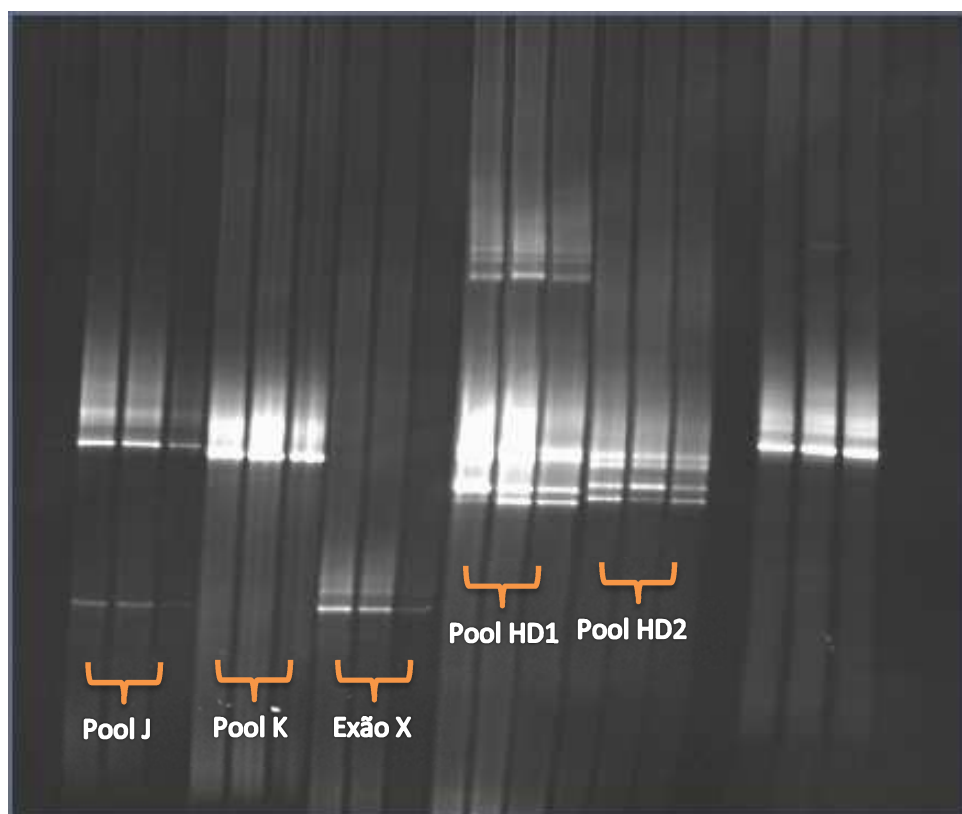


Ilustração 12 - Resultado do Gel de DGGE do gene BRCA2-Exão 11 (continuação)

BRCA1 DGGE Primers

| Exon | Primernaam | Sequentie | Lengte (bp) |
|------|--------------|-------------------------------------|-------------|
| 2 | B1-GC2AF | [40GC]ATGATAAAATGAAGTTGTC | 204 |
| | B1-2AR | ACACTCTAAGATTTTCTGC | |
| | B1-2BF | TTATCTGCTCTTCGCGTTG | 202 |
| | B1-GC2BR | [40GC]CTTCCCTAGTATGTAAGGTC | |
| 3 | B1-3F | GCGCGTTGAGCCTCATTTATTTTC | 185 |
| | B1-GC3R | [40GC]ACAAAAGCTAATAATGGAGC | |
| 5 | B1-GC5F | [40GC]GTATTCTTTCTACAAAAGG | 208 |
| | B1-5R | TCCAACCTAGCATCATTAC | |
| 6 | B1-GC6F | [40GC]TTTTTTTTTTGGTTGATAATCACTTGCTG | 223 |
| | B1-6R | CACTTGAGTTGCATTCTTG | |
| 7 | B1-GC7F | [40GC]ATACATAGGGTTTCTCTTG | 293 |
| | B1-CG7R | CGCAGAAGAAAACAAATGGTTT | |
| 8 | B1-GC8F | [40GC]TTGCTTGACT GTTCTTTACC | 209 |
| | B1-8R | CGCCCGCCACTTAAAAACCTGAGACC | |
| 9 | B1-GC9F | [40GC]CCCTTTTAAT TAAGAAAAC | 191 |
| | B1-9R | ACTAAATAGGAAAATACCAG | |
| 10 | B1-GC10F | [40GC]CATTTGACAGTTCTGCATAC | 217 |
| | B1-10R | TTCAGTGCCTGTTAAGTTG | |
| 11 | B1-GC11F1 | [40GC]ATGACAATTCAGTTTTTGAG | 147 |
| | B1-11R1 | TATTACTGGGTGATGATG | |
| | B1-GC11F2 | [40GC]AGCTGCTTGTGAATTTTCTG | 243 |
| | B1-11R2 | ATAAACTGCTGTTCTCATGC | |
| | B1-GC5T11F3 | [40GC]TTTTTACAAATACTCATGCCAGCTC | 313 |
| | B1-11R3 | TAGGATTCTCTGAGCATGGC | |
| | B1-GC10T11F4 | [40GC]TTTTTTTTTTGTGTGAGAGAAAAGAATGG | 272 |
| | B1-11R4 | CATCTACCTCATTTAGAACG | |
| | B1-11F14 | CTTTCACCCATACACATTTG | 277 |
| | B1-GC11R14 | [40GC]TGCAGTCATTTAAGCTATTC | |
| | B1-GC11F15 | [40GC]GAGTGTCTGTCTAAGAACAC | 221 |
| | B1-11R15 | TATTTGCAGTCAAGTCTTCC | |
| | B1-11F16 | GTTTTCTTCACAGTGCAGTG | 296 |
| | B1-GC5T11R16 | [40GC]TTTTTAAATAGACTGGGGCAAACAC | |
| 12 | B1-GC12F | [40GC]GTCTGCTTTTACATCTGAACC | 221 |
| | B1-12R | AATGCAAAGGACACCACAC | |

Figura 21 - Sequência de primers para o gene BRCA1

| | | | |
|----|-----------|---------------------------|-----|
| 13 | B1-13F | GCGCGATTTTCATTTTCTTGGTGCC | 305 |
| | B1-GC13R | [40GC]GGGAAGGAAAGAATTTTGC | |
| 14 | B1-GC14F | [40GC]TCAGAACAAAGCAGTAAAG | 257 |
| | B1-14R | AAGATGTCAGATACCACAG | |
| 15 | B1-GC15AF | [40GC]ATTGGTGGCGATGGTTTTC | 204 |
| | B1-15AR | CTCCTCCACATCAACAACCT | |
| | B1-15BF | ACTACCCATCTCAAGAGGAG | 196 |
| | B1-GC15BR | [40GC]AAATCAAAGTGTGTGTTCC | |
| 16 | B1-GC16AF | [40GC]GACCAGAACTTTGTAATTC | 299 |
| | B1-16AR | CCAGCAGTATCAGTAGTAT | |
| | B1-16BF | AAAGTTGCAGAATCTGCCC | 252 |
| | B1-GC16BR | [40GC]TAAGTCTTAGTCATTAGGG | |
| 17 | B1-GC17F | [40GC]GTGCTAGAGGTAACATG | 213 |
| | B1-17R | CAGCAGATGCAAGGTATTC | |
| 18 | B1-18F | ACAGCACTTCCTGATTTTG | 222 |
| | B1-GC18R | [40GC]TCTGAGGTGTTAAAGGGAG | |
| 19 | B1-19F | TCTATCTCCGTGAAAAGAG | 176 |
| | B1-GC19R | [40GC]CTGGTTAGTTTGTAACATC | |
| 20 | B1-GC20F | [40GC]TGCTCCACTTCCATTGAAG | 220 |
| | B1-20R | TTTGTCAACTTGAGGGAGG | |
| 21 | B1-GC21F | [40GC]CCTTCTCTCCATTCCCCTG | 182 |
| | B1-21R | AAGGCTGGTGCTGGAATC | |
| 22 | B1-GC22F | [40GC]GCCTGGGTTAAGTATGCAG | 210 |
| | B1-22R | ATTGTGTCCTCCCTCTCTG | |
| 23 | B1-GC23F | [40GC]ACAGTTCCAGTAGTCCTAC | 190 |
| | B1-23R | CATATAGCACAGGTACATG | |
| 24 | B1-GC24F | [40GC]AGCCTAGTCCAGGAGAATG | 251 |
| | B1-24R | TGTGGCTCTGTACCTGTGG | |

Figura 22 - Sequência de primers para o gene BRCA1 (continuação)

Primers:**BRCA1 exon 11 DGGE Primers**

| Primernaam | Sequentie | Lengte (bp) |
|----------------|-------------------------------------|----------------|
| 1Bex11-5FTgc | [40GC]TTTTTTTTGAATCAAATGCCAAAGTAGC | 329 bp |
| 1Bex11-5R | GGACGCTCTTGTATTATCTG | |
| 1Bex11-6F | ATTATAGGAGCATTGTGTTAC | 324 bp |
| 1Bex11-6Rgc | [40GC]TTTTTCGAGTGATTCTATTGG | |
| 1Bex11-7Fgc | [40GC]CAAAAGGTGATTCTATTGAG | 276 bp |
| 1Bex11-7R | ATTAGGTGGGCTTAGATTTT | |
| 1Bex11-8Fgc | [40GC]CAGGCATATTCATGCGCTTG | 281 bp |
| 1Bex11-8R | GAAAGTATCGCTGTCATGTC | |
| 1Bex11-9F | TAAAGAACCTGCAACTGGAG | 300 260 bp |
| 1Bex11-9Rgc | [40GC]AAACCCCTTCTCCACTTAAC | |
| 1Bex11-10Fgc | [40GC]TTTGTCAATCCTAGCCTTCC | 324 bp |
| 1Bex11-10R | ATTAGTCCCTTGGGGTTTTT | |
| 1Bex11-11FTgc | [40GC]TTTTTTTTTAATAAATGTGTGAGTCAGTG | 300 bp |
| 1Bex11-11R | ACATTCCTCTTCTGCATTTT | |
| 1Bex11-12F | ATTCAAGGTTTCAAAGCGCC | 238 bp |
| 1Bex11-12Rgc | [40GC]GTGATATTAAGTGTCTGTAC | |
| 1Bex11-13aFgc | [40GC]AGGAAGAAAATCAAGGAAAG | 223 bp |
| 1Bex11-13aR | TAATGAGTCCAGTTTCGTTG | |
| 1Bex11-13bF | GCCAAATGTAGTATCAAAGG | 248 bp |
| 1Bex11-13bRgc | [40GC]CAGGTGACATTGAATGTTCC | |
| 1Bex11-13cF | AAAATCTGCTAGAGGAAAAC | 259 bp |
| 1Bex11-13cRTgc | [40GC]TTTTTTTTTTCATCACTGGAACCTATTTT | |
| 1Bex11-13dF | TTAAAGAAGCCAGCTCAAGC | 325 bp |
| 1Bex11-13dRgc | [40GC]CTGAAATCAGATATGGAGAG | |
| 1Bex11-13eFgc | [40GC]GCAAGAATATGAAGAAGTAG | 181 bp |
| 1Bex11-13eR | CCATCATCTAACAGGTCATC | |
| 1Bex11-13fFTgc | [40GC]TTTTTTTTTAGTCATGCATCTCAGGTTTG | 232 bp |
| 1Bex11-13fR | ATAAGTTCTCTTCTGAGGAC | 272 |

Figura 23 - Sequência de primers para o gene BRCA1-Exão 11

BRCA2 DGGE Primers

| Exon | Primernaam | Sequentie | Lengte (bp) |
|------|------------|--|----------------|
| 2 | B2-2F | TCCCTGTGTAAGTGCATT | 229 |
| | B2-2R | [40GC]CACTTTCTCGGTGTAATT | |
| 3 | B2-3F | [40GC]ACTAAGGTGGGATTTTTT | 350 |
| | B2-3R | CGCCCCCCCAGTCTACCATATTG | |
| 4 | B2-4F | CACTGAATTATTGTACTG | 226 |
| | B2-4R | [40GC]ATATGTAGGAAAATGTTTC | |
| 5 | B2-5F | AAATAACCTAAGGGATTT | 170 |
| | B2-5R | [40GC]CATTTCTAGTATTCTAAG | |
| 6 | B2-6F | CTTAACAATTTTCCCCTT | 169 |
| | B2-6R | [40GC]GCTATTGTCAAATTCTCA | |
| 7 | B2-7F | [40GC]GATCAGGGCATTCTATA | 248 |
| | B2-7R | CGCCCCTCATCTGCTCTTTCTTG | |
| 8 | B2-8F | [40GC]GTTTTTGCATTCTAGTGATA | 182 |
| | B2-8R | GTTAGCAATTTCAACAGTCT | |
| 9 | B2-9F | [40GC]GAGAGTTTTTATACTAGTGA | 276 |
| | B2-9R | ACAGAGCAAGACTCCACCTC | |
| 10 | B2-10F0 | [40GC]ATGTGCTTCTGT:TTTATACT | 205 |
| | B2-10R0 | CGCCCGCCAAACTATCTTCTTCAGAGGT | |
| | B2-10F1 | [40GC]TTTTTTTTTTAGTATATGAAACAGTTGTAG | 291 |
| | B2-10R1 | CTTCTGATTTGCTACATTTG | |
| | B2-10F2 | [40GC]CTCATTTGTATCTGAAGTGG | 255 |
| | B2-10R2 | CGCCCTTTTGGTCACATGAAGAAAT | |
| | B2-10F3 | [40GC]TTTTTTTTTTTTTTTGGAGCCCAGATGGAGAAAA | 234 |
| | B2-10R3 | CTGTTTCCTCATTTAATGGC | |
| | B2-10F4 | GCGCCACGTATTTCTAGCCTACC | 294 |

Figura 24 - Sequência de primers para o gene BRCA2

| | | | |
|----|----------|--|-----|
| | B2-10F5 | [40GC]GAGAATCACCTAAAGAGACT | 210 |
| | B2-10R5 | GGGGGGCCAGCTTCCATTATCAAT | |
| | B2-10F6 | [40GC]TTTTTTTTTTTTTTTGTTCGCTCAGAGAGGAGGA | 156 |
| | B2-10R6 | CCTGCATTCTTCAAAGCTAC | |
| | B2-10F7 | AGCCACCACCACACAGAATT | 171 |
| | B2-10R7 | [40GC]CTTTCGGTATTTTTTTTCCT | |
| | B2-10F8 | [40GC]GCTATACATGATGAAACATC | 177 |
| | B2-10R8 | GTACCTGAATCAGCATTTC | |
| | B2-10F9 | GCTTTTGAAGCACCATTAC | 138 |
| | B2-10R9 | [40GC]GGAATCGTCATC.TATAAAAC | |
| 11 | B2-11F1 | CGCGTGAATGTGATTGATGGTAC | 284 |
| | B2-11R1 | [40GC]CTGTAGTTTTTCTTATTAC | |
| | B2-11F2 | [40GC]ATCTTGATTATAAAGAAGCA | 219 |
| | B2-11R2 | TGAATGTTGTAAGGGTGAC | |
| | B2-11F3 | AAAAGAAGAGGTCTTGGCTG | 215 |
| | B2-11R3 | [40GC]TTTTTTTTTTTGAAGTGTGACAGAACAA | |
| | B2-11F16 | [40GC]CTTCCTCGTGTGATAAGAG | 472 |
| | B2-11R16 | GGCATGACTTGGCAGTTTAG | |
| | B2-11F17 | GGAAGATGATGAAGTACAG | 214 |
| | B2-11R17 | [40GC]GTGATTGGCAACACGAAAGG | |
| 12 | B2-12F | [40GC]GACTTTTGAGAAATAAACTG | 276 |
| | B2-12R | GATCCACCTGAGGTCAGAAT | |
| 13 | B2-13F | CGCCCGTAATATAAAATAATTGTTTCC | 196 |
| | B2-13R | [40GC]AAACGAGACTTTTCTCATAC | |
| 14 | B2-14F1 | CGCCCGCCGTGTACTAGTCAATAAACTT | 244 |
| | B2-14R1 | [40GC]AGCAGAACTTGATAAAATG | |
| | B2-14F2 | [40GC]TTTTTTTTTTATCTTCAAGCAATTTAGCAG | 277 |
| | B2-14R2 | TACTATCATCAGAGCCATGT | |
| | B2-14F3 | [40GC]TTTTTTTTTTTTTAAACAGACAAAAGCAAAAC | 225 |
| | B2-14R3 | CATCACACAAATTGTCATAC | |
| 15 | B2-15F1 | [40GC]GGTTGTGCTTTTTTAAATTC | 151 |
| | B2-15R1 | CTTCTTAATTTCGCATATCCTG | |
| | B2-15F2 | [40GC]ATTACAAGTCTTCAGAATGC | 254 |
| | B2-15R2 | CGCCCAAAAGCCATCAGTATTGTAG | |
| 16 | B2-16F | [40GC]GTGTGATACATGTTTACTT | 358 |
| | B2-16R | CGCCCGGATGAGGGAATACATAAAA | |
| 17 | B2-17F | [40GC]CAGTATCATCCTATGTGGTT | 303 |
| | B2-17R | CTGCCGTATATGATTACGTA | |
| 18 | B2-18F1 | [40GC]CTCAGTTATTCAGTGACTTG | 345 |
| | B2-18R1 | GATCTAACTGGGCCTTAACA | |
| | B2-18F2 | TTGAACCTACAGATGGGTGG | 248 |
| | B2-18R2 | [40GC]CTGATTTTTTACCAAGAGTGC | |
| 19 | B2-19F | CGCCCGCCATATTTATTAATTTGTCC | 252 |
| | B2-19R | [40GC]TATGGTAAGTTTCAAGAATAC | |
| 20 | B2-20F | TATGTGACTTTTTTGGTGTG | 281 |
| | B2-20R | [40GC]CTCTAAGACTTTGTTCTCAT | |
| 21 | B2-21F1 | [40GC]GTGAATTAATAATCCTTTTG | 127 |
| | B2-21R1 | GCACGAACCTTGCTGTCTTGT | |

Figura 25 - Sequência de primers para o gene BRCA2 (continuação)

| | | | |
|----|---------|------------------------------|-----|
| | B2-21F2 | CATATTTACCATCACGTGCA | 177 |
| | B2-21R2 | [40GC]GCCTCATTATATGTCCTCTT | |
| 22 | B2-22F1 | [40GC]CTAGTTACAATAGATGGAAC | 254 |
| | B2-22R1 | TGTGACATCCCTTGATAAAC | |
| | B2-22F2 | TGGAATCTGCTGAACAAAAG | 169 |
| | B2-22R2 | [40GC]CTGATAAAAACAAAGCATTTAC | |
| 23 | B2-23F1 | GATAATCACTTCTTCCATTG | 205 |
| | B2-23R1 | [40GC]GTTAGCTCTTTCAGATTTAC | |
| | B2-23F2 | [40GC]GAAGGAAAGAGATACAGAAT | 219 |
| | B2-23R2 | CCCGCCCGTTCCATAAACTAACAAGCAC | |
| 24 | B2-24F | [40GC]GTGCTTGTTAGTTTATGGAA | 265 |
| | B2-24R | CGCCCCAAAATTAATATATTGTGC | |
| 25 | B2-25F1 | [40GC]CTTGCATCTTAAAATTCATC | 221 |
| | B2-25R1 | GGTTGCTTGCAATTAAC | |
| | B2-25F2 | CCCGCCCGCTGGCAATAAAGTTTTGGAT | 283 |
| | B2-25R2 | [40GC]CAAAATGTGTGGTGATGCTG | |
| 26 | B2-26F | [40GC]GGAAATACTTTTGGAAACAT | 282 |
| | B2-26R | TTCCCTTGAGTTTACATTAAC | |
| 27 | B2-27F1 | [40GC]ATGATAGGCTACGTTTTTCAT | 220 |
| | B2-27R1 | TTGCAGTTCTTTTGGTCATC | |
| | B2-27F2 | [40GC]GTCTTGTAAGGGGAGAAAG | 256 |
| | B2-27R2 | CGCCCCTGAGGAGAATTCAGTTCTT | |
| | B2-27F3 | [40GC]CTGCACAGAAGGCATTTTCAG | 333 |
| | B2-27R3 | CAGAGATGTAGTACAACGTC | |
| | B2-27F4 | ACCAGTTCAGAAGATTATCT | 209 |
| | B2-27R4 | [40GC]GTCAATAATTTATTGTCGCC | |

Figura 26 - Sequência de primers para o gene BRCA2 (continuação)

BRCA2 exon 11 DGGE Primers

| Primernaam | Sequentie | Lengte |
|-------------|------------------------------------|------------|
| 2B11-4F | AGCACTCTTATTTTAACTCC | 255 bp |
| 2B11-4Rgc | [40GC]TTTTTCAGGTGGCAACAGCTC | |
| 2B11-5Fgc | [40GC]AATGTCAGACAAGCTCAAAG | 245-312 bp |
| 2B11-5R | GCGGCGGTTCTTCAGAGTCTGGATTG | |
| 2B11-6Fgc | [40GC]TAGCATCACCTTCAAGAAAG | 316 bp |
| 2B11-6R | CTGTGTCTCCATATAAAACC | |
| 2B11-7F | TGACTTGTGTAAACGAACCC | 286 bp |
| 2B11-7Rgc | [40GC]GTCCTGCCCATTTGTTTCATG | |
| 2B11-8Fgc | [40GC]GGACATCTCCTTGAATATAG | 265 bp |
| 2B11-8R | GCGGCTTCAACACAAGCTAAACTAG | |
| 2B11-9Fgc | [40GC]GAGCAAAATGTTCTTCAAAG | 301 bp |
| 2B11-9R | GCGGCAATTTCTGCCTTTTGGCTAG | |
| 2B11-10Fgc | [40GC]CCCCTCAGATGTTATTTTCC | 271 bp |
| 2B11-10R | GATCAGCATCTCTGCATTCC | |
| 2B11-11F | AAGTGCCTGAAAACCAGATG | 282 bp |
| 2B11-11Rgc | [40GC]ATGAGCAGAATAAAAGCCCC | |
| 2B11-12F | AGTGCTTCTGGTTATTTAAC | 285 bp |
| 2B11-12Rgc | [40GC]CTTACAGTTTTATCATTATG | |
| 2B11-13Fgc | [40GC]GCAGAGGTACATCCAATAAG | 312 bp |
| 2B11-13R | TTACTTGAATCACTGCCATC | |
| 2B11-14Fgc | [40GC]GAAGATAACAAATATACTGC | 288 bp |
| 2B11-14R | TTACCATGACATGCTTCTTG | |
| 2B11-15aF | GCGGAAGATTTGTCAGATTTAAC | 310 bp |
| 2B11-15aRgc | [40GC]TATGTCAGAATGTAATTCAG | |
| 2B11-15bFgc | [40GC]ATCAGAAACCAGAAGAATTG | 184 bp |
| 2B11-15bR | TACCAACTGGGACACTTTCT | |
| 2B11-15cF | GCGGCCAGACATAGTTAAACACAAA | 265 bp |
| 2B11-15cRgc | [40GC]ATTTCACTAGTACCTTGCTC | |
| 2B11-15dF | GCGGCAGGAATCTTTGGACAAAGTG | 325 bp |
| 2B11-15dRgc | [40GC]GTTTTGAGATTTTCAGTTTG | |
| 2B11-15eFgc | [40GC]TTCTATTGAGACTGTGGTGC | 328 bp |
| 2B11-15eR | TGACCATCAAATATTCCTTC | |
| 2B11-15fF | TGTGAGTCAGACTTCATTAC | 250 bp |
| 2B11-15fRgc | [40GC]TTTTTTTTGTTAGACATGCTACTGTTAC | |
| 2B11-15gFgc | [40GC]TTTTTTTTGTACTATAGCTGAAAATGAC | 319 bp |
| 2B11-15gR | TCCTCAACGCAAATATCTTC | |
| 2B11-15hF | AAAAGATGCAAATGCATACC | 179 bp |
| 2B11-15hRgc | [40GC]CCCTACCTCAAAATTATTAC | |
| 2B11-15iF | GCGGCGCCATGCAGCCATTAAATTGTCC | 197 bp |
| 2B11-15iRgc | [40GC]TACTTTACTGAACTGTCTG | |
| 2B11-15jFgc | [40GC]CAGTGGTAAATCGTTTGTG | 283 bp |
| 2B11-15jR | TCTTCACTCTGAATGTCAGC | |
| 2B11-15kF | TAATGATGAATGTAGCACGC | 206 bp |

Figura 27 - Sequência de primers para o gene BRCA2-Exão 11

| | | |
|-------------|---------------------------------|--------|
| 2B11-15kRgc | [40GC]CTTCCCTATACTACATTTAC | |
| 2B11-15IF | GCGGCCCCGCCACCTTGTGATGTTAGTTTGG | 362bp |
| 2B11-15IRgc | [40GC]ACCACATTATATGAAAAGCC | |
| 2B11-15mFgc | [40GC]GAAGAAAATACTGCTATACG | 211 bp |
| 2B11-15mR | ATCAAATTCCTCTAACACTC | |
| 2B11-15nF | TACAGCAAGTGGAAAGCAAG | 301 bp |
| 2B11-15nRgc | [40GC]TTATTTTCTGAAGAACCACC | |

Figura 28 - Sequência de primers para o gene BRCA2-Exão 11 (continuação)

Exemplo de gel de Agarose, utilizado para análise da mutação c.156_157insAlu:

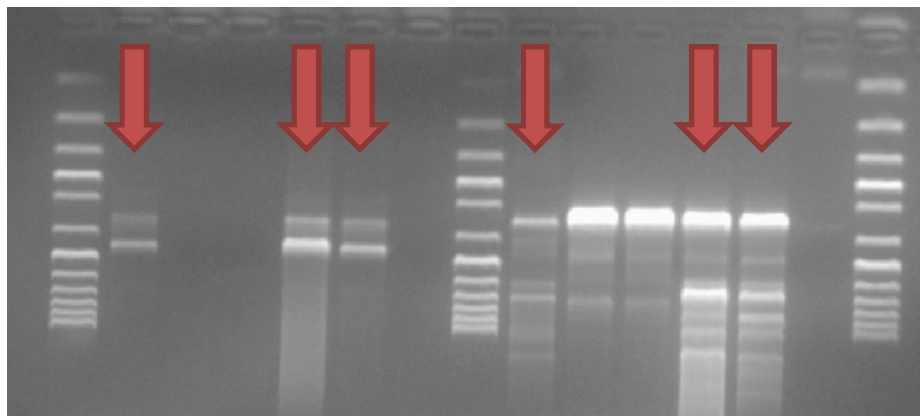


Figura 29 - Exemplo de gel de agarose para análise da presença da inserção Alu no gene BRCA2 (c.156_157insAlu), de acordo com o protocolo descrito por Peixoto e colaboradores (Peixoto et al., 2008) . As setas a vermelho indicam os casos positivos para esta mutação.

Resultados de sequenciação (exemplos):

- Caso N35 (c.3680_3681delTG)

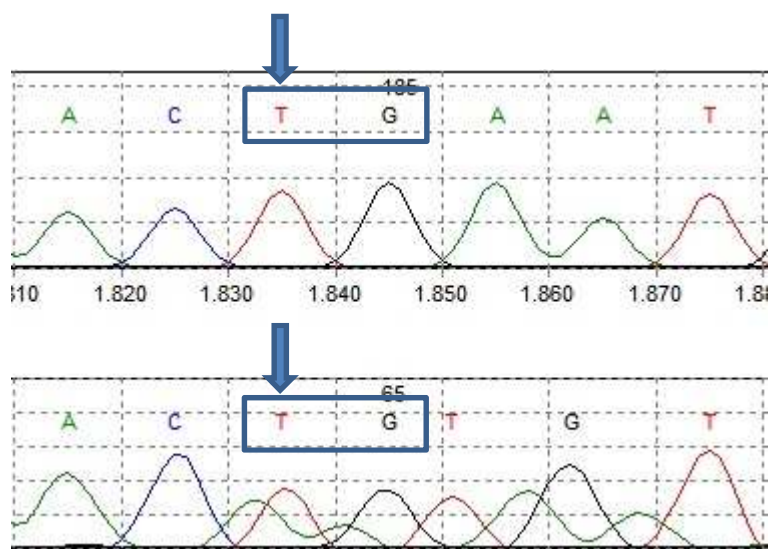


Figura 30 - Exemplo de eletroforograma para uma mutação frameshift (c.3680_3681delTG)

- Caso N3 (c.9382C>T):

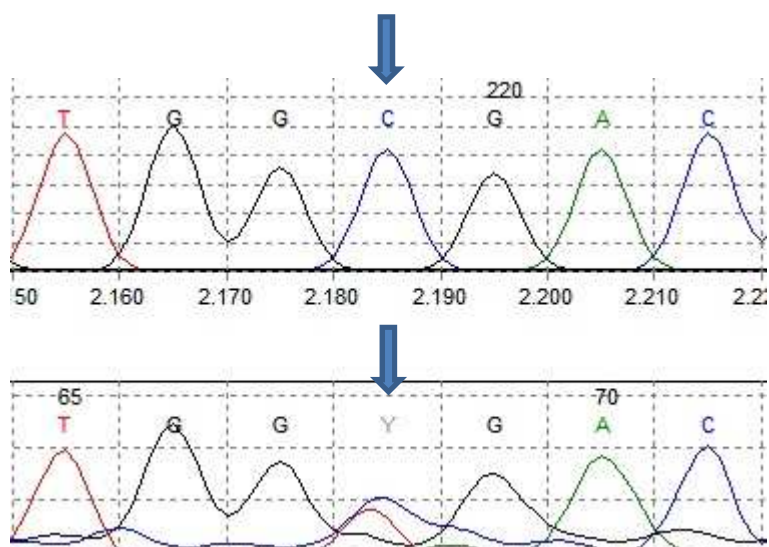


Figura 31 - Exemplo de eletroforograma para uma mutação nonsense (c.9382C>T)